

**Die Bestimmung der Basenzusammensetzung in Desoxy-
ribonukleinstäuren verschiedener Schwämme der Adria mit
Hilfe der Hochdruckflüssigchromatographie an stark sauren
Kationenaustauschern.**

Ferdinand Rutger Hundt

Mainz

1976

Aus dem Institut für Physiologische Chemie
der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Die Bestimmung der Basenzusammensetzung in Desoxy-
ribonukleinsäuren verschiedener Schwämme der Adria mit
Hilfe der Hochdruckflüssigchromatographie an stark sauren
Kationenaustauschern.

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz
den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von
Ferdinand Rutger Hundt
aus Sobernheim

Mainz

1976



Fachbereichsdekan: Professor Dr. med. Dr. rer. nat. Jürgen Grote

Referent: Professor Dr. med. Rudolf K. Zahn

Korreferent: Professor Dr. med. E. Jürgen Zöllner

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Professor Dr. med. Rudolf K. Zahn in der Zeit von Juni 1974 bis Juli 1975 im Institut für Physiologische Chemie der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz durchgeführt.

Herrn Professor Dr. med. Rudolf K. Zahn danke ich aufrichtig für die Überlassung des Themas und finanzielle Unterstützung, der Meeresbiologischen Forschungsgruppe in Rovinj (Jugoslawien) für die Bereitstellung der Schwamm-DNAs.

Herrn Assistenzprofessor Dr. med. Hans-Joachim Breter danke ich besonders für hilfreiche Diskussion und Unterstützung während der Durchführung der Arbeit.

Herrn Rudolf Beyer gilt mein besonderer Dank für die Dichtegradientenzentrifugation.

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen :

DNA	Desoxyribonukleinsäure
dAdo	2'-Desoxyadenosin
dCyd	2'-Desoxycytidin
5MedCyd	5-Methyl-2'-Desoxycytidin
dGuo	2'-Desoxyguanosin
dIno	2'-Desoxyinosin
dThd	2'-Desoxythymidin
5MC	5-Methylcytosin
6MAP	6-Methylaminopurin
E	Extinktion
E ₂₅₄ -Einheiten	Extinktionseinheiten bei 254 nm
nm	Nanometer
Upm	Umdrehung pro Minute
d	Tag (Tage)
h	Stunde (Stunden)
min	Minute (Minuten)
s	Sekunde (Sekunden)
bar	Druckeinheit: $1 \text{ bar} = 10^5 \text{ N/m}^2 = 10^5 \text{ m}^{-1} \cdot \text{kg} \cdot \text{s}^{-2}$
psi	Englische Pfunde pro Quadratzoll (- 0,07 bar)
M (mM)	Molar (Millimolar)
N	Normal
µl	Mikroliter
l	Liter
i.D.	innerer Durchmesser
in	Inch
HPLC	high pressure liquid chromatography

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	DNA-Basenzusammensetzung	7
1.1.1	Allgemeine Aspekte	7
1.1.2	Methylierte Basen	9
1.1.3	Basenzusammensetzung von Schwämmen	13
1.1.4	DNA-Bank und ihre möglichen Anwendungsbereiche	14
1.2	Verfahren zur Bestimmung der Basenzusammensetzung von DNA	15
1.2.1	Hitzedenaturierung	15
1.2.2	Dichtegradientenzentrifugation	18
1.2.3	Absorptionsquotient	19
1.2.4	Bromacetamid-Methode	19
1.2.5	Spektralanalyse	20
1.2.6	Chromatographische Methoden	20
1.2.6.1	Hydrolyseverfahren	20
1.2.6.2	Papierchromatographie	22
1.2.6.3	Dünnschichtchromatographie	24
1.2.6.4	Säulenchromatographie	25
1.2.6.4.1	Konventionelle Ionenaustausch- chromatographie	25
1.2.6.4.2	Hochdruckflüssigchromatographie	27
2	Materialien und Methoden	35
2.1	Apparate	35
2.1.1	Hochdruckflüssigchromatograph	35
2.1.1.1	Pumpen	35
2.1.1.2	Gradientenkammer	35
2.1.1.3	Säulenofen	36
2.1.1.4	Trennsäulen	36
2.1.1.5	UV-Detektor	36
2.1.2	Kompensationsschreiber	37
2.1.3	Integrator 451 A 8	37
2.1.4	Drucker	37
2.1.5	Injektionsspritze	38
2.1.6	pH-Meter	38
2.1.7	Photometer	38

2.2 Materialien	39
2.2.1 Ionenaustauscher	39
2.2.2 Chemikalien	39
2.2.3 Desoxyribonukleoside	39
2.2.4 Enzyme	39
2.3 Untersuchungsmaterial	40
2.4 Reinigung der DNA-Chargen	42
2.4.1 Puffer	42
2.4.2 Gradientenbereitung	42
2.4.3 Zentrifugation	42
2.4.4 Ausdrücken der Röhrchen	42
2.4.5 Sedimentation	43
2.5 Hydrolyse der DNA	43
2.6 Präparation der Trennstülen	43
2.7 Herstellung des Elutionsmittels	44
2.8 Herstellung der Eichlösungen	45
2.9 Bestimmung des Basenquotienten	47
2.9.1 Chromatographiebedingungen	47
2.9.2 Probenaufgabe	47
2.9.3 Integration der Peakflächen	47
2.9.4 Quantitative Bestimmung der Desoxyribonukleosidgehalte der DNA-Hydrolysate	48
2.10 Bestimmung des 5MedCyd-Gehaltes	49
2.10.1 Chromatographiebedingungen	49
2.10.2 Probenaufgabe	49
2.10.3 Quantitative Bestimmung	49
3 Ergebnisse	50
3.1 Basenbestimmungen	50
3.2 Vergleich der Basenzusammensetzung von <i>Geodia cydonium</i> und <i>Geodia limski</i>	82
3.3 Fehlerrechnung	83
4 Diskussion	84
5 Zusammenfassung	94
6 Literaturverzeichnis	96

1 Einleitung

1.1 DNA-Basenzusammensetzung

1.1.1 Allgemeine Aspekte

Unsere heutigen Kenntnisse über die Basenzusammensetzung beruhen grundlegend auf der ersten ausführlichen Arbeit über dieses Thema von Chargaff (17). Er berichtete nicht nur über die vier Hauptbasen der DNA, die Purinbasen Adenin (Ade) und Guanin (Gua) und die Pyrimidinbasen Cytosin (Cyt) und Thymin (Thy) sondern auch über das Vorkommen seltener Basen, der sogenannten Minoritätsbasen (90), wie 6-Methylaminopurin und 5-Methylcytosin.

Die Kenntnisse auf diesem Gebiet haben insbesondere in den letzten zehn Jahren in großem Maße zugenommen. So wurden die Fortschritte vor allem für taxonomische Untersuchungen (systematische Einteilung) von Bakterien auf Grund ihrer DNA-Basenzusammensetzung genutzt, da der $(A+T)/(G+C)$ -Basenquotient für jede Art charakteristisch ist.

Man weiß seit den Arbeiten von Chargaff (17), daß die Basenzusammensetzung bei verschiedenen Spezies in einem weiten Bereich variiert. Der Guanin-Cytosin (GC)-Gehalt schwankt z.B. für die verschiedenen Bakterienstämme zwischen 23 und 74% (79), entsprechend einem Basenquotienten von 0,35 für 74% GC und 3,35 für 23% GC.

Obwohl schon bei einer nahezu unübersehbaren Zahl (ca. 1000) (79) von Spezies DNA-Basenbestimmungen durchgeführt wurden, ist es bis heute nicht gelungen, eine allseits befriedigende Erklärung dafür zu finden, warum die DNA bestimmter Spezies einen hohen und die DNA anderer Spezies einen niedrigen GC-Gehalt aufweist, ob also diese Unterschiede zufällig sind oder auf Grund evolutionärer Einflüsse erfolgten. Hinzu kommt, daß nicht nur Unterschiede in der Basenzusammensetzung auftreten, sondern daß die DNA-Moleküle auch eine gewisse Heterogenität in der Verteilung ihrer Nukleotidbasen aufweisen (7).

Es fällt ferner auf, daß die DNAs von niedrigeren Organismen Basenquotienten aufweisen, die stark variieren, während die höher entwickelter Organismen innerhalb relativ enger Grenzen liegen (Bakterien ca. 0,35 - 3,5; Pflanzen ca. 0,5 - 2,0; Wirbellose ca. 0,6 - 1,7; Wirbeltiere ca. 0,8 - 1,4) (86).

Hinsichtlich der DNA-Basenzusammensetzung der Bakterien wurde diskutiert, ob die Degeneration des genetischen Codes und die Aminosäurezusammensetzung der Proteine in einem Zusammenhang stehen könnten. Ycas (97) berechnete, daß mittels des universell verwendeten degenerierten Basencodes die benötigten bakteriellen Proteine auch dann noch codiert werden können, wenn der GC-Gehalt der DNAs die extremen Werte von 28 bzw. 72% annimmt. Diese GC-Werte liegen auffällig nahe an den bisher für Bakterien ermittelten GC-Gehalten von 23 - 74%.

Diese weite Spanne des GC-Gehaltes bei Bakterien, aber auch bei Protozoen, Pilzen und Algen (7), wird von Singer (79) für die Gruppe der Bakterien auf den Einfluß des ultravioletten Lichtes zurückgeführt. Er sieht einerseits den hohen GC-Gehalt einiger Bakterienarten als eine Abwehrreaktion gegen ultraviolette Strahlung an, andererseits die niedrigen GC-Gehalte als Folge des Einwirkens evolutionärer Faktoren, die nach dieser Theorie in Abwesenheit von ultraviolettem Licht einen Selektionsvorteil bieten, von starker UV-Strahlung aber teilweise oder ganz überlagert werden können.

Durch Bak et al. (8) wurde jedoch gezeigt, daß es auch Bakterienstämme gibt, die, obwohl sie einen hohen GC-Gehalt aufweisen, keiner nennenswerten UV-Bestrahlung ausgesetzt sind. Außerdem stellte diese Arbeitsgruppe große Unterschiede in der Basenzusammensetzung solcher Bakterien fest, deren UV-Belastung nahezu gleich ist.

Bak (7) schließt daraus, daß die Basenzusammensetzung, abgesehen von extremen GC-Werten, in der Regel überwiegend zufällig ist.

Dieser Schluß ist jedoch nicht zulässig, da das Reparatursystem außer durch ultraviolette Strahlung noch durch andere Faktoren beansprucht werden kann (hier z.B. Xeroderma pigmentosum, wo allgemein die Reparaturkapazität eingeschränkt ist.)

Allgemein scheint die Reparaturkapazität ein Selektionsmerkmal für die Lebenserwartung des betreffenden Organismus zu sein.

Darüberhinaus räumt Bak (7) die Möglichkeit ein, daß Variationen des GC-Gehaltes auf sogenannten Mutationsgenen beruhen, wie sie von Freese (28), Cox (23) und Gibson et al. (30) beschrieben wurden. Diese Gene codieren sowohl die Enzyme für die Produktion der Basen als auch die für DNA-Replikation und Reparatur. Man nimmt nun an, daß sie zusätzlich sowohl auf die Mutationsrate als auch auf die Basenzusammensetzung der DNA eine Wirkung ausüben können. Eine erhöhte Mutationsrate wird bei der Anpassung einzelliger Lebewesen an eine neue Umgebung als Vorteil angesehen. Es wäre denkbar, daß nach einer Anpassung an die veränderte Umwelt die Aktivität des Mutationsgens zu einem veränderten GC-Gehalt geführt hat (7).

1.1.2 Methylierte Basen

Chargaff berichtete 1955 (17) über das Vorkommen von 5-Methylcytosin, einer Minoritätsbase, in Kalbsthymus-DNA. In Pflanzen wurden 5 MC -Gehalte von 4-7 Mol% festgestellt (78). In Mäuse-DNA betrug dieser Anteil lediglich 1,5 Mol% (72) und in menschlicher DNA liegt er unter 1,0 Mol% (43). Weitere Minoritätsbasen sind 6-Methylaminopurin (6 MAP) und 5-Hydroxymethylcytosin (90).

Bei der semikonservativen Reduplikation der DNA sind die neu synthetisierten Komplementärstränge im Gegensatz zu den

parentalen zunächst nicht methyliert. Dies bedeutet, daß methylierte Basen nicht als solche in die DNA eingebaut werden. Vielmehr wird kurz nach der Replikation eine Methylgruppe von S-Adenosyl-methionin (SAM) durch spezifische Methylasen auf die entsprechende Base übertragen (10). Dies wurde durch eine Arbeit von Adams (2) bestätigt.

Die Methylierungsprodukte können sich entsprechend dem Watson-Crick-Modell für die DNA normal mit den komplementären Basen paaren und verursachen keine ungepaarten DNA-Regionen oder gar DNA-Brüche (70).

Im Verlauf der Untersuchungen über den Mechanismus der Transkription wurde festgestellt, daß am 5'-Ende natürlicher RNA Guanin bei weitem überwiegt (86). Dies läßt den Schluß zu, daß der Startbereich der DNA, entsprechend den Prinzipien der Basenpaarung, aus einem Oligo-C-Segment besteht. Über das vermehrte Vorkommen von 5MC in Oligopyrimidinclustern haben u.a. Sinsheimer (81), Shapiro (78) und Salomon (71) berichtet.

Ausgehend von diesen Erkenntnissen wird die Rolle von 5MC als Initiator der Transkriptase bei Bakterien diskutiert: Venner (90) meint, daß durch die Methylgruppe eines Startcodons der DNA eine nicht strukturelle Änderung der Transkriptase erfolgt und so die Produktion der für die Transkription notwendigen Enzyme bewirkt wird.

Falls 5MC nicht verwendet wird, bzw. nicht vorhanden ist, kann nach Venner (90) in einigen Fällen 6MAP dessen Funktion übernehmen.

Weiterhin sind methylierte Basen von Bedeutung im Zusammenhang mit Restriktions-Endonukleasen, wie dies ausführlich von Arber (6) ausgeführt worden ist. Diese Enzyme kommen bei den meisten bisher untersuchten Bakterienstämmen vor und sind in der Lage, doppelsträngige DNA an bestimmten Stellen zu spalten. Die DNA der

Bakterien selbst ist jedoch durch Methylierungen modifiziert und dadurch dem Angriff dieser Endonukleasen entzogen. Die Endonukleasen erkennen ebenso wie die Methylasen gleiche Basensequenzen auf ihrem Substrat, der DNA, greifen dann aber an verschiedenen Stellen an. Eine Methylierung der DNA schützt daher nur vor den Nukleasen, die entsprechende Regionen erkennen und diese ohne Modifizierung spalten würden. Arber (6) sieht in diesem Restriktions-Modifikations (R-M)-System einen spezifischen Abwehrmechanismus gegen fremdes genetisches Material, also die Möglichkeit einer Zelle, ihre eigene genetische Information unverändert zu erhalten. Fremde DNA wird nämlich am Fehlen modifizierter Stellen erkannt und durch die Nukleasen sofort zerstört. Die biologische Rolle des R-M-Systems besteht also darin, der Zelle zu ermöglichen, mit einem quasi Immunsystem, welches auf der Basis nativer DNA arbeitet, gegen die Ausprägung fremden genetischen Materials zu reagieren.

Das Vorkommen von R-M-Systemen bei einer großen Zahl von Mikroorganismen läßt den Schluß zu, daß dieses System von großer Wichtigkeit für Bakterien ist. Daß dieses Vorkommen jedoch keine unbedingte Notwendigkeit darstellt, wird deutlich durch die Lebensfähigkeit von sowohl natürlich vorkommenden Stämmen als auch von Mutanten ohne R-M-Systeme, welche im Wachstum keinerlei meßbare Nachteile im Vergleich zu entsprechenden Stämmen mit R-M-Systemen aufweisen.

Unklar ist weiterhin die Frage, ob diese R-M-Systeme auch bei höheren Organismen existieren oder nur bei Bakterien.

Von Vanyushin et al. (88) wird über unterschiedliche 5MC-Gehalte verschiedener Rattengewebe in Abhängigkeit von ihrem Alter, bzw. über die Änderung der 5MC-Gehalte nach der Gabe von Hydrocortison und anderen Gen-Induktoren berichtet. Man stellte fest, daß junge Tiere den höchsten 5MC-Gehalt im Gehirn und Milz aufweisen, den niedrigsten im Nierengewebe.

Im Verlauf von 28 Monaten verringerte sich der 5MC-Gehalt in Herz, Milz und Gehirn deutlich, blieb in etwa gleich in Leber und Lungen und erhöhte sich leicht in Nierengewebe. Zur Erklärung dieses Phänomens werden zwei Möglichkeiten diskutiert:

- erstens, eine Änderung des DNA-Charakters, d.h. ihres physikalischen und chemischen Verhaltens und
- zweitens, eine Änderung im DNA-Methylierungsgrad.

Es zeigt sich, daß weder Vanyushin noch andere Autoren zu Ergebnissen gelangen, die eine Interpretation dieser Befunde durch Änderung des DNA-Charakters zulassen, mit Ausnahme eines veränderten 5MC-Gehaltes.

Man beobachtet allerdings, daß Milz-DNA alter Ratten unter der Einwirkung von Milz-DNA-Methylase erheblich mehr Methylgruppen von $^{14}\text{CH}_3\text{-S-Adenosyl-Methionin}$ aufnimmt als Milz-DNA junger Ratten unter entsprechenden Bedingungen. Dies bedeutet, daß die DNA alter Ratten deutlich geringer methyliert ist als die junger Tiere.

Außerdem wurden von Vanyushin et al. (88) der funktionelle Zustand verschiedener Gewebe und die Genaktivität ihrer Zellen zur Änderung des 5MC-Gehaltes ihrer DNA in Bezug gesetzt, und zwar unter der Wirkung von Gen-Induktoren wie Hydrocortison. Hierbei zeigte sich nach Hydrocortisongabe vor allem bei Leber-DNA ein signifikanter Anstieg des 5MC-Gehaltes, der sich nach 20 Tagen wieder normalisierte und teilweise unter die Ausgangskonzentration absank.

Eine längere Hungerperiode hingegen beeinflusste den 5MC-Gehalt nicht meßbar.

Eine Kombination von Hungerzustand und Hydrocortisongaben führte hingegen bereits nach 5 Tagen zu einem starken Abfall des 5MC-Gehaltes. Dieser Effekt scheint leberspezifisch zu sein, da in anderen Geweben unter diesen Bedingungen keine nennenswerten Änderungen im 5MC-Gehalt festgestellt werden konnten.

Schwankungen des 5MC-Gehaltes führten nicht zu einer strukturellen Veränderung der DNA, wie sich dies z.B. durch eine Variation des Schmelzpunktes oder des GC-Gehaltes manifestieren könnte.

Aus dem besonders deutlichen Absinken des 5MC-Gehaltes in Gehirn und Herz schließt Vanyushin, daß durch den Prozeß des Alterns besonders die postmitotischen Organe betroffen sind. Er führt den geringeren 5MC-Gehalt also nicht auf eine verminderte Methylaseaktivität zurück, sondern insbesondere im Hinblick auf die Wirkung von Hungerzustand und Hydrocortisongaben, auf die sehr niedrige Mitoseaktivität in den betroffenen Geweben. Gleichzeitig räumt er jedoch die Möglichkeit ein, daß der geringere 5MC-Gehalt eine Folge enzymatischer Demethylierung sein könnte.

Es zeigt sich, daß die genaue Erfassung der Zusammensetzung der DNA einschließlich ihres Methylierungsgrades insbesondere für die bisher nicht erklärbaren Phänomene des Alterns weitreichende Bedeutung erlangen könnte.

1.1.3 Basenzusammensetzung von Schwämmen

Schwämme gehören im Tierreich der Gruppe der Metazoen an. Im Gegensatz zu den Bakterien, deren DNA-Basenzusammensetzung durch eine Vielfalt von Untersuchungen bestimmt ist, liegen entsprechende Werte für die DNA-Basenzusammensetzung von Schwämmen bis jetzt nur in geringerem Umfang vor (98).

Die Klassifizierung der Schwämme stützt sich bisher in überwiegendem Maße auf Habitus und Skelett. Es soll Sinn der folgenden Untersuchungen sein, entsprechend der taxonomischen Einordnung von Bakterienstämmen mit Hilfe ihrer DNA-Basenzusammensetzung die begrenzten Möglichkeiten zur Klassifizierung von Schwämmen an Hand der Basenquotienten ihrer DNAs zu erweitern bzw. weiter zu verbessern. Da die Morphologie von Schwämm-

men innerhalb der gleichen Art sehr verschieden sein kann, könnte die Bestimmung des DNA-Basenquotienten zur Unterscheidung verschiedener Spezies sehr hilfreich sein.

1.1.4 DNA-Bank und ihre möglichen Anwendungsbereiche

Am hiesigen Institut befindet sich eine DNA-Bank im Aufbau, die das Wissen um die Zusammensetzung der DNA verschiedenster Organismen vergrößern helfen soll.

Eine andere Arbeitsgruppe des Instituts befaßt sich im Rahmen von Pollutionsuntersuchungen mit Plankton, also frei im Meer schwimmenden Organismen. Eine DNA-Bank könnte die Klassifizierung des Planktons auf Grund von Hybridisierungsverfahren mit aus Plankton gewonnener DNA ermöglichen.

In der Entwicklung vieler Meeresorganismen, wie z.B. der wichtigen Filtrierschwämme, werden frei schwimmende Entwicklungsstufen durchschritten. Diese durchlaufen in ihren ontogenetischen Entwicklungen verschiedene Stadien sehr schnell und daher sind ihre Immunotypen und erst recht ihre Morphologie stark wechselnd und oft nicht faßbar. Die DNA-Information und damit ihre Basenzusammensetzung bleibt aber konstant. Mit Hilfe der Hybridisierungstechnik könnte es daher möglich werden, unbekannte Stadien aufgrund des Hybridisierungsverhaltens ihrer DNA zu erfassen.

Aus diesem Grunde scheint es notwendig, eine DNA-Bank mit reiner, klassifizierter und gut charakterisierter DNA zu schaffen. In diesem Rahmen ist die vorliegende Arbeit also Beitrag zu einem größeren Gesamtvorhaben.

1.2 Verfahren zur Bestimmung der Basenzusammensetzung von DNA

1.2.1 Hitzedenaturierung

Die Überführung von nativer Doppelstrang-DNA in Einzelstrang-DNA (statistische Knäuel) kann durch eine Erhöhung der Absorption im ultravioletten Licht bei 260 nm nachgewiesen werden. Die Umwandlung erfolgt durch Hitzeeinwirkung auf native DNA. Marmur und Doty (50) zeigten 1959, daß die Überführung von nativer DNA zu Einzelstrang DNA innerhalb eines engen Temperaturintervalls erfolgt und daß die Temperatur im Wendepunkt der Absorptions-Temperatur (T_m)-Kurve mit der Basenzusammensetzung der DNA in einem linearen Zusammenhang steht.

Die Faktoren, welche die Denaturierung beeinflussen, sind von Marmur et al. (53) zusammengestellt worden:

- a) Ionenstärke (Doppelstrang-DNA ist bei Raumtemperatur bei einer Ionenstärke von weniger als 10^{-4} M instabil),
- b) pH (außerhalb des Bereiches von 2,7 - 12,0 erfolgt bei Raumtemperatur ebenfalls eine Denaturierung),
- c) Basenzusammensetzung (viele GC-Paare verbessern die thermische Stabilität der DNA bei neutralem pH, nicht jedoch bei einem leicht sauren pH-Wert von z.B. 3,0; als Ursache nimmt man an, daß GC-Paare sowohl bessere Elektronendonatoren als auch bessere Elektronenacceptoren sind als AT-Paare und daß so eine größere Stabilität über die Wasserstoff-Brücken besteht),
- d) Molekulargewicht (der relativ höhere GC-Gehalt sehr hochmolekularer DNA stabilisiert diese relativ besser als niedermolekulare DNA),
- e) denaturierende Agentien (diese stabilisieren denaturierte DNA gegenüber nativer DNA, u.a. sind dies organische Lösungsmittel, Salizylate, Formamide, Sulfoxide, aromatische Verbindungen, mutagene Substanzen, Nukleoside und eine Anzahl von Alkoholen, welche die Denaturierungstemperatur der DNA senken),

- f) physikalische und chemische Einwirkungen (hier sind Röntgenstrahlen und Hydroxylamin zu nennen),
- g) Diamine und Polyamine (hier besteht bei der Anwesenheit der genannten Substanzen in der DNA-Lösung ein linearer Zusammenhang zwischen dem AT-Gehalt der DNA und der Erniedrigung ihrer Denaturierungstemperatur),
- h) Bildung von Quervernetzungen (hier sind UV-Licht, salpetrige Säure und bifunktionelle alkylierende Agentien zu nennen).

Die Absorptions-Temperatur-Kurve denaturierter DNA von Mikroorganismen zeigt einen S-förmigen Verlauf (7). Eine Abweichung von dieser Form weist auf Intramolekulare Heterogenität der Basenzusammensetzung, denaturierte Regionen oder RNA-Verunreinigungen hin. Auch der Einfluß von Strahlen kann zu einer Veränderung der S-Form der Absorptions-Temperatur-Kurve führen (46).

Die Absorptionserhöhung liegt meist im Bereich von 40%. Das Absorptionsverhältnis beträgt für die Wellenlängen 260 und 280 nm etwa 1,8 - 2,0. Geringere Werte werden bei Verunreinigungen mit Proteinen erhalten, während kleine Mengen von Polysacchariden das Verhältnis nicht beeinträchtigen. Eine Absorptionseinheit entspricht bei einer Wellenlänge von 260 nm einer Konzentration von 45 µg nativer DNA/ml (7).

Auf Grund des stabilisierenden Effekts von Kationen auf DNA (31) ist das Temperaturintervall, in dem eine Denaturierung stattfindet, in hohem Maße von der Salzkonzentration abhängig. Deshalb wird normalerweise bei Standard-Salzkonzentrationen gearbeitet. Die Temperaturgrenzen für die Denaturierung bei Standard-Salzkonzentrationen betragen 69,3°C und 110,3°C, was einem GC-Gehalt von 0% bzw. 100% entsprechen würde (51).

Möglicherweise hat der Gehalt an seltenen (Minoritäten-) Basen (z.B. 5-Hydroxymethylcytosin, 5-Methylcytosin, 7-Methylguanin) einen Einfluß auf den Schmelzpunkt der DNA. Nach De Ley (25) hat das Vorkommen von 5-Hydroxymethylcytosin in der DNA von (T-gerade) Phagen von E. coli keinen Einfluß auf den T_m -Wert,

der entsprechend dem GC-Gehalt erwartet wird. Takahashi und Marmor (85) fanden jedoch erniedrigte T_m -Werte bei Phagen von *B. subtilis*, deren DNA Uracil oder 5-Hydroxymethyluracil an Stelle von Thymin enthält.

De Ley (25) hat 1970 eine Überprüfung der Arbeit von Marmor und Doty (51) durchgeführt, um die Linearität zwischen T_m -Wert und GC-Gehalt zu untersuchen. Sie wurde mit einem Korrelationsfaktor von 0,98 bei GC-Werten im Bereich zwischen 30-75% bestimmt.

Vergleiche der T_m -Methode mit der Dichte-Gradienten-Zentrifugation wurden von Mandel et al. (45) und von De Ley (25) durchgeführt. Dabei wurden teilweise bakterielle DNAs verwendet. In diesen Untersuchungen fand sich eine gute Linearität, wenn sich auch zeigte, daß bei hohen GC-Gehalten die Verwendung der T_m -Methode geringfügig höhere GC-Gehalte liefert.

Bei bakterieller DNA wird oft eine Abnahme der Steilheit der T_m -Kurve gefunden. Diese asymmetrische Veränderung tritt hierbei meist im Bereich niedriger Temperaturen auf. In diesem Zusammenhang wird diskutiert, ob Regionen der DNA mit stellenweise vermehrtem AT-Gehalt (AT-clusters) für dieses Phänomen verantwortlich sind (7).

Biphasische Kurven können beim Vorhandensein zweier verschiedener DNA-Spezies auftreten. Dies ist zum Beispiel bei einigen Halobakterien der Fall (36).

Die Gesamt-DNA eukaryotischer Zellen wird ebenfalls oft heterogen erscheinen auf Grund der Anwesenheit cytoplasmatischer (mitochondrialer) DNA mit einer von der Kern-DNA abweichenden Basenzusammensetzung. Insbesondere der GC-Gehalt der mitochondrialen DNA ist eindeutig geringer als der der entsprechenden Kern-DNA (9).

1.2.2 Dichtegradientenzentrifugation

Diese Methode erfordert eine relativ aufwendige Ausrüstung. Der GC-Gehalt einer DNA wird dabei durch Gleichgewichtszentrifugation bestimmt. Diese erfolgt in einem Konzentrationsgradienten, der in der Lösung eines schweren Salzes, z.B. CsCl oder Cs_2SO_4 , aufgebaut wird. Es besteht, wie die Arbeiten von Sueoka et al. (84) und Schildkraut et al. (73) zeigen, ein linearer Zusammenhang zwischen der gefundenen Dichte und dem GC-Gehalt der DNA.

Die Bestimmung der Dichte ist im Prinzip ohne Anwendung einer Referenzsubstanz möglich. Gewöhnlich jedoch wird ein "marker", d.h. eine DNA mit bekanntem GC-Gehalt und bekannter Dichte, eingesetzt. Als solcher dient meist E. coli DNA mit einer Dichte von $1,710 \text{ g/cm}^3$ (7). Eine Reihe von Autoren gibt für die Dichte von E. coli DNA jedoch den Wert von $1,704 \text{ g/cm}^3$ an (91).

Bei der Anwendung der Methode muß streng darauf geachtet werden, daß die verwendete DNA hoch nativ ist, da denaturierte, einzelsträngige DNA eine um $0,015 \text{ g/cm}^3$ höhere Dichte aufweist als die entsprechende native DNA (84).

Ein besonderer Vorteil bei der Anwendung dieser Methode liegt in der äußerst geringen Menge an Material, welches zur Untersuchung benötigt wird. Es genügt nämlich etwa $1 \mu\text{g}$ DNA, die zudem nicht hochgereinigt sein muß, also etwa RNA-Verunreinigungen enthalten kann.

Unter normalen Bedingungen sind die Breite, bzw. Homogenität der Banden ein Parameter für das Molekulargewicht bzw. die innermolekulare Heterogenität der Basenzusammensetzung der untersuchten DNA (57).

Ein weiterer Vorteil der Methode ist ihre Anwendbarkeit zur Identifizierung geringer Mengen DNA, welche sich in ihrer Basenzusammensetzung von der Haupt-DNA unterscheidet. Bei-

spiele hierfür sind die Entdeckung episomaler DNA in Bakterien durch Marmur et al. (52) und die Bestimmung mitochondrialer DNA in Hefe durch Bak et al. (9).

Bei der Verwendung dieser Methode muß aber auch mit Dichtewerten gerechnet werden, die nicht der tatsächlichen Basenzusammensetzung der untersuchten DNA entsprechen. Beispiele hierfür sind die DNAs von (T-gerade)-Phagen, welche glucosilierte DNA mit einem hohen Gehalt an 5-Hydroxymethylcytosin enthalten (7), sowie die DNA von einigen *B. subtilis* Phagen, welche außer Uracil auch 5-Hydroxymethyluracil aufweist (46).

1.2.3 Absorptionsquotient

Dieses Verfahren beruht auf einer Arbeit von Fredericq et al. (29) aus dem Jahre 1960. Dabei wird die Absorption von in 0,1 N Essigsäure denaturierter DNA bei pH 3,0 gemessen. Der Quotient aus den Extinktionen, die bei 260 und 280 nm erhalten werden, entspricht demjenigen, der für ein synthetisches Gemisch aus den vier Nukleotiden mit gleicher relativer Basenzusammensetzung gefunden wird.

Die Methode ergibt gleich gute Resultate wie andere Verfahren und ist sehr schnell durchführbar. Nachteilig ist jedoch die relativ geringe Genauigkeit in der Bestimmung der GC-Gehaltes von $\pm$ 3%. Ein weiterer Nachteil besteht darin, daß nur hochgereinigte DNA verwendet werden kann (7).

1.2.4 Bromacetamid-Methode

Dieses von Wang (95) eingeführte Verfahren zur DNA-Basenbestimmung beruht auf der Reaktion eines DNA-Säurehydrolysates mit N-Bromacetamid. Dieses reagiert quantitativ mit den Basen, nicht jedoch mit Adenin. Dabei wird eine Änderung der Absorption der Lösung im Bereich von 260 - 280 nm bewirkt. Die verbleibende Restabsorption ermöglicht mit Hilfe einer Eich-tabelle die Bestimmung des prozentualen Anteils des Adenins in der Ge-

samtlösung.

Schwierigkeiten bestehen bei der Untersuchung von DNA mit relativ hohem GC-Gehalt. Hier erhält man nach der chemischen Umsetzung mit N-Bromacetamid nur noch eine geringe Restabsorption, so daß die Bestimmung notwendigerweise ungenau wird.

Die Methode eignet sich andererseits sehr gut zur Bestimmung des Adenin-Gehaltes solcher DNAs, die seltene (Minoritäts-) Basen wie z.B. Uracil, Hydroxymethyluracil, Methylcytosin und Hydroxymethylcytosin enthalten (7).

1.2.5 Spektralanalyse

Diese Form der Basenbestimmung (89) wurde lediglich von ihren Autoren benutzt.

Das Prinzip der Methode besteht in der Anwendung verschiedener Gleichungen, welche eine Korrelation zwischen den Absorptionswerten bei verschiedenen Wellenlängen und dem Gehalt an Basen einer untersuchten DNA herstellen.

1.2.6 Chromatographische Methoden

1.2.6.1 Hydrolyseverfahren

Eine genaue Bestimmung der DNA-Basenzusammensetzung wurde zunächst durch die Entwicklung von Hydrolysemethoden ermöglicht, die eine totale Freisetzung der Basen bewirken (93). Nukleotide oder Nukleoside sind aus DNA weder durch alkalische noch durch Säurehydrolyse darstellbar.

a) Salzsäurehydrolyse (96)

Dabei werden die Purine durch eine milde Säurebehandlung bei pH 1,6 und 37°C während 24 h oder bei pH 2,8 und 100°C während einer Stunde freigesetzt. Es entsteht Apurinsture.

Eine drastischere Behandlung ist notwendig, um die Pyrimidinbasen freizusetzen. 10 mg DNA werden in 2 ml 6 N HCl während zwei Stunden auf 120°C erhitzt.

Man erhält alle Basen in freier Form, einschließlich des 5-Methylcytosins, wenn zunächst mit heißer Trichloressigsäure, dann mit 6 N HCl unter CO₂ bei 100°C für drei Stunden in verschlossenen Röhrchen hydrolysiert wird.

b) Perchlorsturehydrolyse

Dieses Verfahren wurde von Marshak und Vogel (54) eingeführt. Dabei wird DNA mit 7,5 N HClO₄, RNA mit 12 N HClO₄ bei 100°C während 40 min hydrolysiert.

5-Hydroxymethylcytosin wird durch dieses Vorgehen jedoch in großem Maße zerstört (96).

c) Ameisensturehydrolyse

Vischer und Chargaff (93) beschrieben 1948 die Vorteile von Ameisensture bei der Herstellung von DNA-Hydrolysaten. Bei der Verwendung von Ameisensture (98-100%), 2 h, 175°C, unterbleibt die Desaminierung von Cytosin und somit seine Umwandlung zu Uracil.

d) Enzymatische Hydrolyse

Ein Überblick über die Anwendung von Enzymen zur DNA-Hydrolyse wird von Cohn (20) gegeben. Die Freisetzung der Nukleoside beruht dabei auf der Einwirkung von Desoxyribonukleasen, Phosphodiesterasen und Phosphomonoesterasen (Phosphatasen) auf die DNA.

Die nachfolgend verwendeten E.C. Nummern entsprechen der von der IUB (35) vorgeschlagenen Kennzeichnung.

Desoxyribonuklease I (Pankreasdesoxyribonuklease) (E.C.3.1.4.5): 1903 beobachtete Araki (5) die Fähigkeit von Extrakten aus Thymus, Leber und Milz, eine Verflüssigung von DNA hervorzurufen. Das gleiche Phänomen wurde von Abderhalden und Schittenhelm (1) nach dem Einwirken von Hundepankreas-

sekret auf DNA beschrieben. Im Hydrolysat konnten jedoch weder freie Basen noch anorganisches Phosphat gefunden werden. Feulgen (26) berichtete 1935 über Oligonukleotide als Endprodukte des Nukleinsäureabbaus.

Für die enzymatische Aktivität der DNase I ist die Anwesenheit von Mg^{++} - (27) oder anderer bivalenter Ionen (55) unbedingt erforderlich.

Phosphodiesterase (E.C. 3.1.4.1) :

Die Phosphodiesterbindungen von Oligodesoxyribonukleotiden werden durch einen Extrakt aus Schlangengiften gespalten, sofern keine freien Phosphomonoester in großer Menge im Reaktionsansatz vorhanden sind und eine inhibitorische Wirkung ausüben (74). Hierbei entstehen freie 5'-Mononukleotide (im Gegensatz zur Milz-Phosphodiesterase, welche 3'-Mononukleotide freisetzt).

Phosphomonoesterasen (E.C. 3.1.3.1) :

Klein (42) berichtete über die Darstellung von Desoxyribonukleosiden nach Einwirkung von Glycerinextrakten der Darmschleimhaut auf DNA. Schmidt et al. (75) fanden, daß die Behandlung eines DNA-DNase-Hydrolysates mit intestinaler Phosphatase zur Freisetzung von Nukleosiden führte. Die Phosphatasen hydrolysieren alle Mononukleotide, die Position der Phosphorsäuregruppierung im Nukleotid-Molekül (3'-Monophosphat oder 5'-Monophosphat) ist dabei bedeutungslos (74).

1.2.6.2 Papierchromatographie

Nach den ersten Anwendungen der Papierchromatographie für die Nukleinsäureanalytik durch Vischer und Chargaff (92) und Hotchkiss (34) in den Jahren 1947-48 wurden bei der Erforschung der Nukleinsäuren und ihrer Derivate in den folgenden Jahren große Fortschritte gemacht.

Überblicke über die Methodik und die Möglichkeiten der Papierchromatographie wurden u.a. von Block (11), Cramer (24) und, mit Blick auf ihre Anwendung in der Nukleinsäureforschung, von Wyatt (96) gegeben.

Vischer und Chargaff (92) trennten die Purine eines Säurehydrolysates (2% H_2SO_4 während 3 h bei 100°C) an 50 cm langen Papierstreifen in einer Lösung aus Chinolin/Collidin/Wasser (3/1/1,5). Um die Purine sichtbar zu machen, wurden die Papierstreifen zunächst mit Quecksilbernitrat, dann mit Ammoniumsulfid behandelt. Es entstehen Purin-HgS-Komplexe. Die Positionen von Guanin, Adenin und Xanthin werden durch klar voneinander getrennte Flecken aus HgS gekennzeichnet. Auf diese Art war es möglich noch Mengen von 5 μg Purinbasen zu detektieren (96). Zur quantitativen Bestimmung wurde das Absorptionsverhalten der Purinbasen im ultravioletten Licht verwendet. Aus einem zweiten, nicht behandelten Papierstreifen wurden die betreffenden Areale herausgeschnitten, die Purinbasen mit warmer 1 N HCl extrahiert und anschließend photometrisch bestimmt (92,93).

Später wurde für die Detektion der Basen auf dem Papierstreifen lediglich ihr Absorptionsverhalten im UV-Licht bei 254 nm ausgenutzt. Bei Betrachtung im ultravioletten Licht erscheinen sie als dunkle Flecken (96).

Für die Trennung von DNA-Komponenten mit Hilfe der Papierchromatographie sind mehr als 80 verschiedene Lösungsmittelsysteme entwickelt worden (96). Ihre Zusammensetzung kann variieren nach Wasser- und Salzgehalt, nach pH und Art der organischen Komponenten.

Nukleoside und Nukleotide können mit der Papierchromatographie ebenfalls getrennt werden. Für quantitative Bestimmungen werden dabei ihre Absorptionseigenschaften im ultravioletten Licht verwendet, die dem der Basen im wesentlichen entsprechen. Hier bieten sich zusätzlich noch Reaktionen der Zucker- und Phosphatgruppen zur Identifizierung an (96).

1.2.6.3 Dünnschichtchromatographie

Für die Untersuchung der Nukleinsäuren mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie stehen verschiedene stationäre und mobile Phasen zur Verfügung. Ein allgemeiner Überblick findet sich bei Stahl (83).

Die meistverwendeten Sorptionsmittel sind Cellulose (und Cellulose-derivate), Ionenaustauscher und Kieselgel.

Cellulose.

Reine Cellulose, häufig auch bestimmte Derivate, stellt das am häufigsten verwendete Sorptionsmittel dar (60) und wird auch von Randerath (68) für die Trennung von Basen und Nukleosiden empfohlen. Die Trennung erfolgt dabei zweidimensional mit verschiedenen Laufmitteln: In der ersten Dimension werden z.B. eine Mischung von Methanol/konz.HCl/Wasser (7:2:1), in der zweiten Dimension N-Butanol/Methanol/Wasser/konz. Ammoniak (60:20:20:1), verwendet. Der Vorteil des Verfahrens liegt in der Schärfe der Trennung, der hohen Empfindlichkeit, der Schnelligkeit und nicht zuletzt in der Einfachheit der Anwendung.

Einen Überblick über die Anwendungsmöglichkeit von Cellulose in der Dünnschichtchromatographie zur Trennung von Nukleinsäurebausteinen vermittelte Pataki (60), der u.a. auch für die Papierchromatographie entwickelte Techniken auf die Cellulosedünnschichtchromatographie übertragen hat.

Ionenaustauscher

Die Anwendung von Ionenaustauschern hat sich nach den ersten Arbeiten von Cohn (18) über die Trennung von Nukleotiden an Anionenaustauschern im wesentlichen durchgesetzt. Randerath beschreibt Trennungen an Cellulose-Derivaten (64,65), unter anderem an DEAE-Cellulose (67) und berichtete 1962 über die Verwendung von Polyäthylenimin-Cellulose (PEI-Cellulose) zur Trennung von Nukleotiden und Nukleosiden (69).

Kieselgel

Dieses Material wird in der Nukleinsäureanalytik relativ selten verwendet, obwohl es sich auch für präparative Dünnschichtchromatographie eignet (60).

Nach der Trennung ist eine Identifizierung der DNA-Derivate durch ihr unterschiedliches Absorptionsverhalten im ultravioletten Licht möglich.

Quantitative Analysen erfolgen im allgemeinen photometrisch (63,61), da diese Methoden zu große Verluste von Untersuchungsmaterial weitgehend ausschließen.

1.2.6.4 Säulenchromatographie

1.2.6.4.1 Konventionelle Ionenaustauschchromatographie

Die physikalischen Prinzipien des Ionenaustausches wurden zuerst an Mineralien entdeckt und führten zur Verwendung synthetischer Silikate (Zeoliten), um Calcium-Ionen im Austausch gegen Natrium-Ionen aus Wasser zu entfernen (24). Später wurden von der Industrie eine Reihe synthetischer Stoffe entwickelt, die der Ionenaustauschchromatographie zu breiter Anwendung verhelfen. Hier sind besonders die Polystyrole zu nennen, welche als Anionen- und Kationenaustauscher erhältlich sind. Bei ihnen ist der Grad der Vernetzung, d.h. die Umwandlung von linear angeordneten Vinylbenzolmolekülen in dreidimensionale Molekülstrukturen durch Einsatz von Divenylbenzol, variabel. Für die Trennung von Nukleinsäurederivaten wird ein Vernetzungsgrad von 2-10% benötigt (56, 80, 94). Sehr vorteilhaft wirkt sich auch die chemische Stabilität der Polystyrole aus. Chemische Nebenreaktionen sind bei der Verwendung von Polystyrolen als Matrix vernachlässigbar (21), allerdings muß mit Adsorptionsphänomenen gerechnet werden.

Cohn (18) nutzte als Erster die Vorteile dieser Austauscher zur Trennung von Nukleinsäurebasen aus, da alle Purin-

und Pyrimidinbasen wenigstens eine funktionelle Gruppe aufweisen, die in der Lage ist, eine negative bzw. positive Ladung auszubilden (21).

Cohn hydrolysierte RNA entweder mit Ameisensäure (93) oder HCl (54) und trennte die Purin- und Pyrimidinbasen an Kationenaustauschern. Als Elutionsmittel diente 2 N HCl. An Anionenaustauschern gelang die Trennung der Basen, hier verwendete Cohn jedoch zur Elution einen $\text{NH}_4\text{OH-NH}_4\text{Cl}$ -Puffer (18) oder ein Ameisensäuresystem (19), das auch die Trennung von Basen, Nukleosiden und Nukleotiden ermöglichte.

Von Cohn (20) wird auch die Trennung von enzymatisch hydrolysiert DNA (also von Mononukleotiden) an Ionenaustauschern beschrieben. Cohn und Volkin (22) trennten mit Hilfe eines Ameisensäuresystems enzymatisch aus RNA bzw. DNA freigesetzte Ribonukleotide (siehe 1.2.6.1 d) an Anionenaustauschern.

Die Identifizierung der aufgetrennten DNA-Komponenten ist grundsätzlich durch die Anwendung von empfindlichen Spektrophotometern auf Grund ihres unterschiedlichen Absorptionsverhaltens im ultravioletten Licht möglich (20).

Auf Nukleosidebene wurden Nukleinsäureuntersuchungen u.a. von Uziel et al. (87) und Breter (14) ausgeführt. Durch dieses Vorgehen wird einerseits das Auftreten von 2'- und 3'-Isomeren verhindert, wie sie bei der alkalischen Hydrolyse von RNA entstehen, andererseits vermeidet man drastische Verfahren, die zur Darstellung der freien Basen notwendig sind. Die Trennung (87) wird an einem Kationenaustauscher mit Ammoniumformiatpuffer, pH 4,6, als Elutionsmittel durchgeführt, was die bei der Anwendung von Säuren möglichen Veränderungen im Probenmaterial und an der technischen Ausrüstung verhindert.

Uziel et al. (87) benutzten einen modifizierten Nukleotid-Analyzer nach Anderson (3), der durch Anwendung eines Pumpensystems in einer 23,0 cm x 0,6 cm Trennstufe hohe Durchflußraten erzielte.

Für schnelle Analysen wählten sie eine Durchflußrate von $0,4 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, bessere Trennungen wurden bei einer Rate von $0,1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ erhalten. Routinemäßig wurde bei einer Durchflußrate von $0,25 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ gearbeitet, ein Wert, der einen Kompromiß zwischen Schnelligkeit und Güte der Trennung darstellt.

1.2.6.4.2 Hochdruckflüssigchromatographie

Diese Form der chromatographischen Trennung vereinigt z.T. die Vorteile von Gaschromatographie und konventioneller Säulenchromatographie.

Nach Schätzungen können mit Hilfe der Gaschromatographie nur 20% aller bekannten organischen Lösungen getrennt werden (82). Gaschromatographie ist nicht anwendbar bei solchen Substanzen, die 1. nicht in den gasförmigen Zustand überführt werden können (Molekulargewichte über 300, ionisierte Verbindungen) und die 2. thermolabil sind.

Bei der konventionellen Säulenchromatographie werden Säulen mit einem Durchmesser von ca. 1-2 cm (oder mehr) mit Trennmaterial (Partikeldurchmesser 100-150 μ) gefüllt. Die mobile Phase fließt mit Hilfe der Gravitation oder durch Verwendung niedriger hydrostatischer Drucke durch die Säule. Dabei müssen lange Trennzeiten und geringe Auflösung in Kauf genommen werden.

In der Hochdruckflüssigchromatographie kommen Säulen mit geringem innerem Durchmesser (1-3 mm) zur Anwendung und das Füllmaterial besteht aus Partikeln mit einem Durchmesser unter 30 μ . Die mobile Phase muß dann allerdings mit hohem Druck durch die Säule gepumpt werden, meist mit Durchflußraten zwischen 0,1 und $0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Dabei werden unter Verwendung hochempfindlicher Detektoren kurze Trennzeiten und hohe Auflösung erzielt. Weitere Vorteile ergeben sich durch die nahezu unbegrenzte Variationsbreite der flüssigen mobilen Phase (während in der Gaschromato-

graphie nur wenige Trägergase zur Verfügung stehen) durch die große Zahl an verfügbaren stationären Phasen sowie durch die Anwendung relativ niedriger Temperaturen (50–80°C) während der Trennung.

Im Bereich der Nukleinsäureanalytik hat die Hochdruckflüssigchromatographie durch Verwendung des automatisierten Nukleotid-Analyzers von Anderson (4) starke Impulse erhalten. Fortschritte wurden auch durch Horvath et al. (33), Kirkland (38) u.a. erzielt, die mit kleiner Partikelgröße, geringen Säulendurchmessern und hohen Säulendruckten unter Verwendung von Präzisionshochdruckpumpen mit sehr konstanter Förderleistung arbeiteten.

Diese Technik wurde durch die Anwendung von hochempfindlichen UV-Detektoren (33,39), welche meist bei 254 nm arbeiten, weiter verbessert.

In den Jahren 1967–70 wurden durch eine Reihe von Autoren (33, 15,41) die theoretischen Grundlagen zur Optimierung der Trennungen von Substanzen mit Hilfe der Hochdruckflüssigchromatographie erarbeitet. Eine Übersicht über diese theoretischen Grundlagen zur Hochdruckflüssigchromatographie, deren Beherrschung die Voraussetzung für eine sinnvolle Anwendung der Methode darstellt, wurden von Snyder (82), Kirkland (40) und Brown (16) gegeben.

Die Trennung zweier Substanzen mit Hilfe der Chromatographie wird durch ihre verschieden große Bindungsfähigkeit an die Säulenmatrix, d.h. ihre unterschiedliche Verweildauer in der Trennsäule erzielt. Bei genügend kleiner Probenmenge werden die Komponenten derart von der Säule eluiert, daß im Elutionsdiagramm symmetrische, Gauss-verteilte Chromatographiegipfel erscheinen. In diesem Fall ist die Retentionszeit (t_R) unabhängig von der Probenmenge, die Verteilung der Substanzen innerhalb der mobilen und stationären Phase in einer Säule erfolgt linear, d.h. eine Vergrößerung der Probenmenge in der mobilen Phase geht mit einer proportionalen Vergrößerung der Substanz in der stationären Phase einher, man spricht von einer linearen Elution.

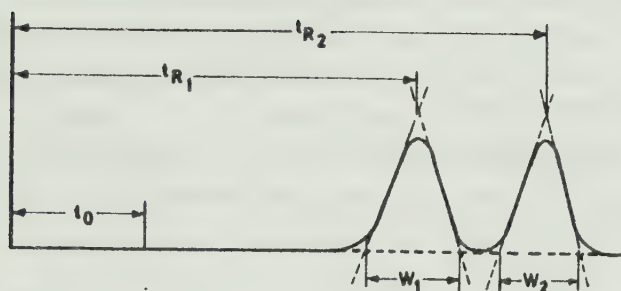


Abb. 1-1

Elutionsdiagramm zweier Komponenten gleicher Bandenbreite

- t_0 - Elutionszeit einer nicht retinierten Substanz (Durchbruchzeit, engl. nonsorbed time),
- t_{R1} - Elutionszeit der retinierten Substanz 1
- t_{R2} - Elutionszeit der retinierten Substanz 2
- w_1 - Bandenbreite der Substanz 1, dargestellt als Strecke zwischen den Schnittpunkten aus den Tangenten durch die Wendepunkte der Bande und der Grundlinie,
- w_2 - Bandenbreite der Substanz 2

Das Retentionsvolumen (V_R) einer retinierten Substanz kann ausgedrückt werden durch (I),

$$V_R = V_M + K \cdot V_S \quad (I)$$

es bedeutet V_M - Volumen an mobiler Phase, K ist der Verteilungskoeffizient (Konz. an Substanz in der stationären Phase/Konz. an Substanz in der mobilen Phase) und V_S bezeichnet das Volumen der stationären Phase.

Als Kapazitätsfaktor (k) bezeichnet man den Quotienten aus den Mengen einer Substanz, die sich in der stationären bzw. mobilen Phase finden (II).

$$k = K \frac{V_S}{V_M} \quad (II)$$

Die Gleichungen (I) und (II) können entsprechend Gleichung (III) zusammengefaßt werden.

$$V_R = V_M (1 + k) \quad (III)$$

Bei Kenntnis der Durchflußrate ($\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$) können Volumina (V_R und V_M) in die entsprechenden Retentionszeiten (t_R und t_o) überführt werden. Wird zusätzlich nach k aufgelöst, findet sich (IV).

$$k = \frac{V_R}{V_M} - 1 = \frac{V_R - V_M}{V_M} = \frac{t_R - t_o}{t_o} \quad (IV)$$

Der Kapazitätsfaktor kann so als das Verhältnis von Netto-retentionszeit ($t_R - t_o$) zur Durchbruchzeit (t_o) definiert werden. Da t_R und t_o direkt aus dem Elutionsdiagramm zu entnehmen sind, kann k leicht aus jedem beliebigen Chromatogramm ermittelt werden.

Die Durchbruchzeit (t_o) entspricht dem Quotienten aus Säulenlänge und Geschwindigkeit der mobilen Phase (L/v), (IV) kann somit überführt werden in (V).

$$t_R = \frac{L}{v} (1 + k) \quad (V)$$

Man sieht, daß eine Verlängerung der Säule auf das Doppelte eine Vergrößerung der Retentionszeit (t_R) um den Faktor 2 zur Folge hat. Aus einer Verdoppelung der Geschwindigkeit der mobilen Phase (v) resultiert eine um die Hälfte verminderte Retentionszeit (t_R). Es ist zu beachten, daß bei einer gegebenen Durchflußrate die Geschwindigkeit der mobilen Phase vom Durchmesser der Trennsäule abhängig ist, und zwar vom Quadrat ihres Radius. D.h., die Verwendung einer Säule mit 1 mm i.D. anstelle einer Säule mit 3 mm i.D. erhöht die Durchflußgeschwindigkeit um den Faktor 9.

Nach Karger (37) ist es möglich, die Auflösung zweier Komponenten (R) mit Hilfe der Gleichung (VI) darzustellen.

$$R = 2 \left(\frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_1 + w_2} \right) \quad (VI)$$

Es ist ersichtlich, daß die Auftrennung um so besser wird, je weiter die Elutionsgipfel der beiden Substanzen voneinander entfernt sind.

Von Wichtigkeit ist weiterhin der Einfluß der Wanderungsstrecke (Säulenlänge, L) auf die Trennung der Elutionsgipfel und die Bandenbreiten. Die Entfernung der Elutionsgipfel, in Abb. 1-1 entsprechend ($t_{R2} - t_{R1}$), ist direkt proportional der Säulenlänge (L), die Bandenbreite (w) vergrößert sich jedoch nur proportional zur Quadratwurzel der Säulenlänge (L). Dies bedeutet, daß die Verwendung einer längeren Trennsäule eine Verbesserung der Auflösung bewirkt und zwar proportional zur Verlängerung, während der Verbreiterung der Banden relativ geringere Bedeutung zukommt.

Eine einfache Darstellung des Zusammenhanges der wichtigsten Chromatographie-Parameter, die auch die soeben aufgeführten Grundlagen einschließt, vermittelt die von Karger (37) als Grundgleichung des chromatographischen Prozesses gegebene Gleichung (VII).

$$R = \frac{1}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k_2}{1 + k_2} \right) (N)^{1/2} \quad (\text{VII})$$

Sie stellt eine Beziehung her zwischen Auflösung (R) und drei fundamentalen Parametern, nämlich der relativen Retention (α), dem Kapazitätsfaktor (k), und der Zahl der theoretischen Böden (N) einer Trennsäule.

α , k, und N sind mit Hilfe derjenigen Größen darstellbar, die leicht jedem beliebigen Elutionsdiagramm entnommen werden können (Abb. 1-1).

Die relative Retention (α) ist definiert als der Quotient der Nettoretentionszeiten beider Komponenten. Bei Verwendung von Gleichung (IV) kann α auch durch das Verhältnis der Kapazitätsfaktoren dargestellt werden (VIII).

$$\alpha = \frac{t_{R2} - t_o}{t_{R1} - t_o} = \frac{k_2}{k_1} \quad (\text{VIII})$$

α ist also ein Maß für die Trennung der Elutionsgipfel zweier Komponenten mit Hilfe einer Trennsäule.

Bei einem Wert von $\alpha = 0$ ist die Auflösung ebenfalls = 0, unabhängig von der Zahl der theoretischen Böden. Geringe Veränderungen von α können jedoch eine große Auswirkung auf die Auflösung haben, vor allem bei Werten von α im Bereich von 1, ein Effekt der durch den $\left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right)$ -Term in Gleichung (VII) bewirkt wird. Wenn z.B. α von 1,1 auf 1,2 zunimmt, dann wird nahezu eine Verdoppelung der Auflösung erreicht, obwohl α nur um 10% zugenommen hat.

Der Kapazitätsfaktor (k) ist als das Verhältnis von Nettoretentionszeit ($t_R - t_o$) zu Durchbruchzeit (t_o) definiert. Nettoretentionszeit und Durchbruchzeit sind linear abhängig von den Volumina in der mobilen und stationären Phase, in denen sich eine Substanz verteilt. Der Kapazitätsfaktor repräsentiert also das Verteilungsverhalten einer Substanz während ihrer Wanderung durch die Trennsäule.

k liegt bei konventionell gepackten Trennsäulen meist in einem Bereich über 20, ist also hoch genug um den k-Term $\left(\frac{k}{k+1} \right)$ in (VII)

zu vernachlässigen.

Bei der Hochdruckflüssigchromatographie sind die k -Werte jedoch relativ klein, eine Folge des in diesem Verfahren geringen Quotienten aus den Volumina der stationären und mobilen Phase (siehe Gleichung (II)). Dem Kapazitätsfaktor kommt also in der Hochdruckflüssigchromatographie eine besondere Stellung zu. Entsprechend seiner Definition in (IV) erhält man besonders schnelle Trennungen bei kleinen k -Werten bzw. hohe Auflösung bei großen k -Werten. Dies zwingt dazu, einen Kompromiß zwischen Schnelligkeit und Güte der Auflösung einer Trennung zu finden.

N , die Anzahl der theoretischen Böden in einer Säule, beeinflusst die Bandenbreite einer eluierten Substanz nach einer bestimmten Wanderungszeit. N stellt also ein Maß für die Effektivität einer Trennsäule dar. Eine große Bodenzahl bewirkt bei gleicher Retentionszeit (t_R) eine geringere Bandenverbreiterung als eine niedrige Bodenzahl. Da die Bandenverbreiterung als Standardabweichung σ_t , der jeweiligen Gauss-Verteilung dargestellt werden kann (Abb. 1-1), läßt sich der in Gleichung (IX) dargestellte Zusammenhang finden.

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{w} \right)^2 = \left(\frac{t_R}{\sigma_t} \right)^2 \quad (IX)$$

Nach (VII) ist die Auflösung (R) proportional der Quadratwurzel aus der Zahl der theoretischen Böden (N). Diese Beziehung ist für die Durchführung von chromatographischen Trennungen von großer Bedeutung: Nach (IX) ist N proportional der Säulenlänge (L), da nach Gleichung (V) $t_R \propto L$. Es besteht somit die Möglichkeit, durch eine Verlängerung der Trennsäule einen größeren Wert für N zu erhalten und die Auflösung zu verbessern. Dieser Vorteil wird jedoch, da die Retentionszeit (t_R) ebenfalls proportional der Säulenlänge (L) ist, mit einer längeren Trenndauer erkauft. Es gibt jedoch die Möglichkeit, diesen Nachteil durch die Verwendung der entsprechenden Matrix und durch die Anwendung von hohen Drucken fast gänzlich zurückzudrängen.

Für praktische Belange wird von Karger (73) und von Snyder (82) die Gleichung (VII) als ausgezeichnete Möglichkeit angesehen, die Bedingungen einer Trennung durch die Veränderung der drei genannten Faktoren unabhängig voneinander zu beeinflussen:

α ist ein Maß für die Selektivität des Trennsystems und kann durch geeignete Wahl der mobilen und stationären Phase variiert werden.

N ist ein Maß für das Auflösungsvermögen eines Systems und kann durch eine Veränderung der Säulenlänge bzw. der Durchflusgeschwindigkeit der mobilen Phase variiert werden.

k ist ein Maß für das Verteilungsverhalten einer Substanz im Trennsystem und kann durch die Stärke der mobilen Phase beeinflusst werden.

2. Materialien und Methoden

2.1 Apparate

2.1.1 Hochdruckflüssigchromatograph

Für die Anfertigung der chromatographischen Trennungen wurde ein Hochdruckflüssigchromatograph der Fa. Varian, Darmstadt (BRD), Typ LCS 1000, verwendet. Alle Komponenten dieses Systems sind in einem Gehäuse zweckmäßig vereinigt.

Es sind dies 1. zwei Pumpen, eine für den Transport des Elutionsmittels gegen hohen Druck durch die Trennsäule und eine Gradientenpumpe zur Förderung der zweiten Lösungskomponente bei Verwendung einer Gradientenelution, 2. die Trennsäule, meist eine Stahlkapillare mit 1-3 mm i.D. und einer Länge von 30 - 300 cm, und 3. ein hochempfindlicher 254 nm UV-Detektor in Doppelstrahlbauweise.

2.1.1.1 Pumpen

Als Hochdruckpumpe findet eine Milroyal HDB 1-29 R Verwendung. Sie ist ausreichend pulsgedämpft, um einen möglichst konstanten Fluß zu erreichen. Die Pumpe arbeitet gegen einen Maximaldruck von 210 bar. Zur Vermeidung einer Überlastung ist ein Überdruck-Sicherheitsschalter eingebaut, der bei Überschreitung des zulässigen Maximaldruckes die Säulenpumpe automatisch abschaltet.

Die Gradientenpumpe, die lediglich zur Förderung der zweiten Lösungskomponente im Falle einer Gradientenelution dient, ist eine Milton Roy Minipumpe.

2.1.1.2 Gradientenkammer

Die Gradientenmischkammer faßt ca. 220 ml (was sich im Regelfalle als zu groß erweist) und ist mit einem Rührstab zur intensiven Durchmischung der Lösungskomponenten ausgerüstet.

Mit Hilfe eines Heizfingers kann das Lösungsmittel, um die Bildung von Luftblasen in der Säule zu verhindern, vor dem

Eintritt in das Hochdrucksystem entsprechend der benötigten Säulentemperatur entgast werden.

2.1.1.3 Säulenofen

Da die meisten Trennungen in der Hochdruckflüssigchromatographie nicht bei Zimmertemperatur durchgeführt werden können, werden die Trennsäulen in einer temperierbaren Kammer gehalten. Die Aufrechterhaltung einer konstanten Temperatur wird auf $\pm 1^{\circ}\text{C}$ durch ein Gebläse mit heißer Luft gewährleistet.

2.1.1.4 Trennsäulen

Die Stahlkapillaren mit einem Innendurchmesser von 1,8 mm und einem Außendurchmesser von 1/8 Zoll wurden von der Fa. Varian, Darmstadt (BRD), bezogen.

Säulendichtungen, Verbindungsstücke mit einem ausgesprochen niedrigen Totvolumen (low dead volume fittings), sowie die Säulendstücke aus Sintermaterial mit einer Porenweite von $0,5\text{ }\mu\text{m}$ wurden von der Fa. Kontron, Eching bei München (BRD), geliefert.

2.1.1.5 UV-Detektor

Der im LCS 1000 verwendete Detektor arbeitet auf der Basis eines doppelstrahligen Ultraviolett-Spektrophotometers mit Niederdruck-Quecksilberdampfampe bei einer Wellenlänge von 254 nm. Die Durchflußzelle weist bei einem Lichtweg von 1 cm ein Meßzellenvolumen von nur $8\text{ }\mu\text{l}$ auf, was erheblich zur Steigerung der Leistungsfähigkeit des Detektors beiträgt.

Die Empfindlichkeit beträgt $0,0001\text{ E}_{254}$ -Einheiten bei einer Abweichung von weniger als $0,0002\text{ E}_{254}$ -Einheiten pro Stunde.

Der Detektor zeigt die Extinktionsdifferenz zwischen Durchfluß- und Referenzzelle an, wobei im Regelfalle die Referenzzelle nicht mit Lösungsmittel, sondern mit Luft gefüllt ist. Die Anzeige erfolgt nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz streng konzentrationsabhängig in einem Bereich zwischen 0,02 und $0,65\text{ E}_{254}$ -Einheiten. Im nicht-linearen Bereich ist außerdem die Anzeige bis zu einer Grenze von $1,3\text{ E}_{254}$ -Einheiten möglich.

2.1.2 Kompensationsschreiber

Zur Registrierung der Elutionsdiagramme wird ein Kompensationsschreiber der Fa. Varian GmbH Darmstadt (BRD), Model 20, mit einem 10 mV span element, verwendet.

Der Papiervorschub wird bei allen Experimenten auf 10 in/h (= etwa 25,4 cm/h) eingestellt. Auf die Welle des Servomotors ist ein 200 Ω Drehpotentiometer (Fa. Beckman, München (BRD)) mit 3,5 Umdrehungen aufgesetzt, welches mit einem 200 Ω Schleifpotentiometer des Integrators über eine Wheatstone-Brücke verbunden ist.

2.1.3 Integrator 451 A 8

Der Integrator ist über ein 200 Ω Schleifpotentiometer mit dem 200 Ω Drehpotentiometer des Kompensationsschreibers über eine Wheatstone-Brücke verbunden. Die durch den Schreiberausschlag bewirkten Spannungsdifferenzen der Brücke werden von dem Servomotor des Integrators linear umgesetzt und ermöglichen somit die zeitliche Erfassung der Spannungsänderungen.

Der wesentliche Teil des Integrators besteht, stark vereinfacht, aus einem Servomotor, an dessen Welle sich eine Lochscheibe befindet. Eine vor der Lochscheibe befindliche Photozelle nimmt je nach Drehgeschwindigkeit der Welle bzw. der Lochscheibe verschieden viel Impulse einer hinter der Lochscheibe befindlichen Lichtquelle auf und registriert diese Aufnahme über eine Digitalanzeige.

In diesem Falle wird das Flächenintegral einer eluierten Bande in der Form von Zählem einer Digitalanzeige dargestellt.

2.1.4 Drucker

An den Integrator ist außerdem ein Drucker bzw. ein automatisches Zählwerk angeschlossen, welches nach Wiedererreichen der Grundlinie den vom Integratorzählwerk angegebenen Wert ausdrückt.

Die Bauteile für den Drucker wurden von der Fa. Zeissler, Troisdorf (BRD) bezogen, der Ausbau erfolgte durch Hrn. Dipl. Physiker M. Michaelis, Mainz.

2.1.5 Injektionsspritze

Zur Applikation der Analysenlösungen auf die Trennstülen wurde eine 10 µl Spritze, Typ 701, von der Fa. Hamilton, Bonaduz (Schweiz), verwendet.

2.1.6 pH-Meter

Es wurde ein pH-Meter der Fa. Sargent Welch, Modell NX, verwendet.

2.1.7 Photometer

Zur Extinktionsbestimmung wurde ein Zeiss Spektrophotometer, Typ PMQ II der Fa. Zeiss, Oberkochen/Württ. (BRD), verwendet.

2.2 Materialien

2.2.1 Ionenaustauscher

Ein stark saurer Kationenaustauscher aus sulfoniertem Styrocopolymer, Typ M 71, mit einem Partikeldurchmesser von 10-12 μm , wurde von der Fa. Beckman Instruments, München (BRD), bezogen.

2.2.2 Chemikalien

25% Ammoniak,

96-98% Ameisensäure,

Natriumhydroxidplättchen,

MgCl_2 ,

alle Substanzen wurden p.a. von der Fa. E. Merck, Darmstadt (BRD), bezogen.

2.2.3 Desoxyribonukleoside

2'-Desoxyadenosin (dAdo), Molgewicht 252,25,

2'-Desoxyguanosin (dGuo), Molgewicht 267,25,

2'-Desoxycytidinumchlorid (dCyd), Molgewicht 263,68 und

2'-Desoxythymidin (dThd), Molgewicht 242,23

wurden von der Fa. E. Merck, Darmstadt (BRD), bezogen.

5'-Methyl-2'-Desoxycytidin (5MedCyd), Lot Nr. 326242,

von PL Biochemicals, Milwaukee, Wi.(USA) und

2'-Desoxyinosin (dIno), Nr. 6 30 10 01,

von Papierwerke Waldhof-Aschaffenburg, Mannheim (BRD).

2.2.4 Enzyme

Alkalische Phosphatase (E.C. 3.1.3.1) aus Kälberdarm, Reinheitsgrad I, für analytische Zwecke hochgereinigt von Adenosin-desaminase, stammt von der Fa. Boehringer, Mannheim (BRD).

Desoxyribonuklease I (E.C. 3.1.4.5) 2000 units/vial,

sowie

Schlangengift Phosphodiesterase (E.C. 3.1.4.1) 5 mg/vial von Worthington Biochemical Corporation, Freehold, New Jersey (USA).

2.3 Untersuchungsmaterial

Die Schwämme wurden von Mitarbeitern des Institutes für Physiologische Chemie der Johannes-Gutenberg-Universität in der Bucht von Rovinj, Istrien (Jugoslawien) gesammelt.

Die Präparation der DNA erfolgte nach der von Hönig et al. (32) beschriebenen Methode. Die Reinigung der DNA Chargen erfolgte nach 2.4.

Die Klassifizierung der Schwämme nach Riedel (69) erfolgte nach folgender Einteilung:

- | | |
|------------|--------------|
| 1. Stamm | Porifera |
| 2. Klasse | Calcispongae |
| 3. Ordnung | Homocoela |
| 4. Familie | Clathrinae |
| 5. Gattung | Clathrina |
| 6. Art | coreacea |

Wegen der besseren Übersicht wurden im folgenden die Gattungs- und Artbezeichnungen zuerst aufgeführt und im übrigen die Reihenfolge umgekehrt.

- | | | |
|-------|-----------------------|--|
| 2.3.1 | Clathrina coreacea | Clathrinae, Homocoela,
Calcispongae, Porifera |
| 2.3.2 | Chondrosia reniformis | Chondrosidae, Homosclerophorida,
Demospongiae, Porifera |
| 2.3.3 | Geodia cydonium | Geodidae, Tetractinellida,
Demospongiae, Porifera |
| 2.3.4 | Geodia limski | Geodidae, Tetractinellida,
Demospongiae, Porifera |
| 2.3.5 | Ancorina cerebrum | Geodidae, Tetractinellida,
Demospongiae, Porifera |
| 2.3.6 | Tethya limski | Tethyidae, Hadromerina,
Demospongiae, Porifera |
| 2.3.7 | Tethya lyncurium | Tethyidae, Hadromerina,
Demospongiae, Porifera |
| 2.3.8 | Suberites domuncula | Suberitidae, Hadromerina,
Demospongiae, Porifera |
| 2.3.9 | Axinella polypoides | Axinellidae, Halichondrina,
Demospongiae, Porifera |

2.3.10 <i>Hemimycale columella</i>	Axinellidae, Halichondrina, Demospongiae, Porifera
2.3.11 <i>Mycale massa</i>	Mycalidae, Poecilosclerina, Demospongiae, Porifera
2.3.12 <i>Mycale tunicata</i>	Mycalidae, Poecilosclerina, Demospongiae, Porifera
2.3.13 <i>Crella rosea</i>	Crellidae, Poecilosclerina, Demospongiae, Porifera
2.3.14 <i>Pellina semitubulosa</i>	Crellidae, Haplosclerina, Demospongiae, Porifera
2.3.15 <i>Petrosia ficiformis</i>	Crellidae, Haplosclerina, Demospongiae, Porifera
2.3.16 <i>Dissidea avara</i>	Dysideidae, Keratosa, Demospongiae, Porifera
2.3.17 <i>Hippospongia communis</i>	Spongiidae, Keratosa, Demospongiae, Porifera
2.3.18 <i>Cacospongia scalaris</i>	Spongiidae, Keratosa, Demospongiae, Porifera
2.3.19 <i>Verongia aerophoba</i>	Spongiidae, Keratosa, Demospongiae, Porifera.

Die Schwämme 2.3.6 sowie 2.3.7 sind bei Riedel (69) nicht aufgeführt. Sie wurden zwanglos nach Müller und Zahn (59), sowie nach Zahn (98) eingefügt.

2.4 Reinigung der DNA-Chargen

Die Reinigung der DNA-Chargen erfolgte in der Ultrazentrifuge in einem CsCl-Gradienten, basierend auf den Arbeiten von Meselson et al. (57) und Marmur (49).

2.4.1 Puffer

2.4.1.1 Puffer zum Lösen der DNA

0,05 M CsCl

0,015 M Trispuffer

beide mit einem pH von 8,0

2.4.1.2 CsCl-Lösung in 0,015 M Trispuffer pH von 8,0;

$$n \frac{D}{20} = 1.400$$

2.4.1.3 Versetzen der DNA mit Puffer 2.4.1.1 um die DNA zu lösen und quellen zu lassen, für die Dauer von 48 Stunden bei 4°C im Kühlschrank.

ca. 0,5 mg DNA/ 1 ml Puffer

2.4.2 Gradientenbereitung

Pro Röhrchen werden etwa 500 mg festes CsCl und 0,5 ml der DNA-Lösung eingefüllt (= 250 µg DNA/Röhrchen). Sodann werden die Röhrchen mit CsCl-Lösung 2.4.1.2 bis zu 3 mm unter den Rand gefüllt und auf gleiches Gewicht gebracht (+ 10 mg).

2.4.3 Zentrifugation

Die Röhrchen werden dann in einer Spinco L 2-50 B Zentrifuge im Rotor SW 40 Ti bei 33.000 UpM = $1,35 \cdot 10^5 g$ und einer Laufzeit von ca. 96 Std. = $7,77 \cdot 10^8 g \cdot \text{min}$ zentrifugiert.

2.4.4 Ausdrücken der Röhrchen

Die Röhrchen werden fraktionsweise ausgedrückt. Jede Fraktion enthält 0,8 ml. Der erste Tropfen jeder Fraktion wird bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Die Fraktionen des Extinktionsgipfels werden vereinigt.

2.4.5 Sedimentation

Die Fraktionen eines Gradienten, in denen sich DNA findet, werden mit Wasser verdünnt und im SW 40 TO Rotor bei 40.000 UpM für 24 Stunden sedimentiert.

Die Proben enthalten CsCl dann nur noch in Spuren. Jede Probe enthält ca. 200 µg DNA/ml Wasser.

2.5 Hydrolyse der DNA

Der enzymatische Abbau der verwendeten DNA erfolgte in Anlehnung an ein von Breter und Zahn (14) verwendetes Verfahren.

Es wurden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben :

100 µl DNA-Lösung,

50 µl Trispuffer, pH 8,0, 50 mmolar,

20 µl $MgCl_2$, 0,07 molar,

50 µl Desoxyribonuklease I,

50 µl Schlangengift Phosphodiesterase.

Das Reaktionsgemisch wurde für 24 Stunden im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Dann wurden hinzugegeben :

20 µl alkalische Phosphatase,

10 µl NaOH, 0,001 N.

Der Ansatz wurde für weitere 6 Stunden im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Anschließend wurden die Proben eingefroren und erst kurz vor Gebrauch aufgetaut.

2.6 Präparation der Trennstülen

Die Stülen zur Ausführung der Chromatographie wurden in Anlehnung an das Verfahren von Scott und Lee (77) gepackt.

Dazu wird vor die 40 cm lange Trennstüle eine in Durchmesser und Länge größere vorgeschaltet und mit einer Aufschwemmung (engl. slurry) des Ionenaustauschers gefüllt. Diese Stülenkombination wird dann mit der Pumpe verbunden und das Trennmateriel unter hohem Druck - verglichen mit den konventionellen Packmethoden, bei denen man die Gravitation ausnutzt - in der Trennstüle gepackt. Dadurch wird eine Entmischung

der Aufschlammung nach Teilchengröße verhindert, was zu einer ungleichmäßigen Verteilung der Ionenaustauscherpartikel in der Säule und somit zu einer Beeinträchtigung der Auflösung der Säule führen mußte.

Die besten Resultate erhält man, wenn man die Säule vor Beginn des Packungsvorganges mit Elutionsmittel füllt: So wird die Bildung von Luftblasen während des Packvorganges verhindert und es können keine Turbulenzen entstehen, die eine nachteilige Entmischung der Teilchen verursachen.

Bei einem Druck von 150 bar (ca. 2.200 psi) wird die Säule für 90 min gepackt.

Anschließend wird die Säule eingebaut und eine weitere Stunde bei einem Druck von 100 bar (ca. 1.500 psi) äquilibriert.

2.7 Herstellung des Elutionsmittels

Als Elutionsmittel wird ein 0,4 Mol/l Ammoniumformiatpuffer, pH 4,6, verwendet.

Zur Herstellung des Puffergemisches werden unter dem Abzug 32 ml 25%ige Ammoniaklösung - entsprechend 0,4 Molen NH_3 - mit ca. 500 ml bidestilliertem Wasser versetzt und mit 17 ml 96-98% Ameisensäure gemischt.

Die auftretende Neutralisationswärme wird durch ein Eisbad kompensiert. Nach dem Abkühlen der Lösung auf 25°C (pH ca. 7,5), wird der gewünschte pH-Wert durch Zugabe von 1 : 10 verdünnter Ameisensäure eingestellt.

Dann wird die Lösung in einem Glaskolben mit bidestilliertem Wasser auf einen Liter aufgefüllt und anschließend der pH-Wert nochmals kontrolliert.

2.8 Herstellung der Eichlösungen

Die Konzentration jeder Eichlösung wird durch die Bestimmung der Extinktion bei der Wellenlänge des Extinktionsmaximums bestimmt. Der Gehalt der Lösung wird durch folgende Formel berechnet:

$$\frac{E}{\xi \cdot 10^{-3}} = C \text{ (pmol/}\mu\text{l)}$$

Hierbei bedeutet: E - Gemessene Extinktion beim Extinktionsmaximum,
 ξ - die spezifische Extinktion,
C - die Konzentration der Eichlösung.

Die Reinheit der erhaltenen Desoxynukleosidlösungen wird durch Ermittlung typischer Quotienten aus den Extinktionen bei 250/260/280 und 290 nm nach (76) für dAdo, dCyd, dGuo, dIno und dThd, sowie nach (62) für 5MedCyd bestimmt (siehe Tabelle 2-1).

2.8.1 Hauptnukleoside

dAdo, dCyd, dGuo und dThd werden in Puffertitrisol, pH 7,0, gelöst.

2.8.2 seltene Desoxynukleoside

2.8.2.1 dIno wird in Puffertitrisol mit einem pH von 6,0, gelöst.

2.8.2.2 5MedCyd wird in 0,1 N HCl gelöst. Hier wird außerdem nach der Konzentrationsbestimmung eine Neutralisation von jeweils 5 ml Eichlösung durch 40 μl 10 N KOH durchgeführt.

2.8.3 Herstellung der Mischungen

2.8.3.1 Mischung I

Hier werden jeweils 50 μl der Hauptdesoxynukleoside sowie dIno in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und bei -30°C eingefroren.

2.8.3.2 Mischung II

Es werden außer den 5 Desoxynukleosiden der Mischung I noch jeweils 50 μl 5MedCyd in das Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert. Auch diese Lösung wird bei -30°C eingefroren.

Tabelle 2 - 1

	max	$\frac{E}{x \cdot 10^{-3}}$	250/260		280/260		290/260	
			soll	ist	soll	ist	soll	ist
dAdo	259	15,0	0,79	0,80	0,15	0,162	0,01	0,008
dCyd	271	9,0	0,83	0,831	0,965	0,97	0,305	0,308
dGue	252,5	13,7	1,15	1,142	0,67	0,667	0,27	0,27
dIno	249	12,3	1,67	1,678	0,24	0,245	0,03	0,034
dThd	267	9,6	0,65	0,642	0,72	0,71	0,24	0,23
5MedCyd	286,5	12,0	0,43	0,425	3,00	3,09	-	-

2.9 Bestimmung des Basenquotienten

2.9.1 Chromatographiebedingungen

Als Elutionsmittel wird ein 0,4 molarer Ammoniumformiatpuffer, pH 4,6, verwendet (14). Die Temperatur im Säulenofen beträgt 55°C. Der Druck, der durch die Säulenpumpe aufgewendet wird, beträgt 56 bar (ca. 800 psi), welches einer Durchflußrate von 13,3 ml/h bzw. einer Durchflußgeschwindigkeit von $8,7 \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$ entspricht.

2.9.2 Probenaufgabe

Die Proben werden nach dem Auftauen durchgeschüttelt um zu verhindern, daß sich auf Grund der verschiedenen Gefrierpunkte der Lösungsteile Konzentrationsunterschiede in der Mischung einstellen könnten.

Im stop-flow-Verfahren werden die Proben auf die Trennsäule aufgegeben: Die Säulenpumpe wird abgeschaltet. Nachdem der Druck in der Säule völlig abgefallen ist, wird der Säuleneingang geöffnet.

10 µl einer Eichlösung, bzw. 2 - 20 µl eines DNA-Hydrolysates, je nach im Hydrolyseansatz verwendeter DNA-Menge, werden mit einer Injektionsspritze mit 7 cm Nadel direkt in das Austauscherebett der Säule injiziert.

Nach der Abdichtung des Hochdrucksystems werden die Säulenpumpe und der Kompensationsschreiber in Gang gesetzt.

2.9.3 Integration der Peakflächen

Nach Beendigung des Pressure-Peaks im Elutionsdiagramm und Erreichen einer konstanten Grundlinie, wird der Servomotor des Integrators über die beiden 200 Ω Potentiometer (siehe 2.1.2 und 2.1.3) abgeglichen und die Digitalanzeige des Integrators auf Null gestellt. Nach der Aufzeichnung jeder Bande wird nach Wiedererreichen der Grundlinie das entsprechende Flächenintegral vom Integrator digital angezeigt, sowie vom nachgeschalteten Zählwerk ausgedruckt.

2.9.4 Quantitative Bestimmung der Desoxyribonukleosidgehalte der DNA-Hydrolysate

Es sind mehrere Rechengänge erforderlich. Nach Formel (1) wird ein Desoxyribonukleosidspezifischer Referenzwert ermittelt:

$$\frac{I_{\text{Eichlösung}}}{C} = R \quad (1)$$

Es bedeuten: $I_{\text{Eichlösung}}$ - der Integrationswert einer Bande der Eichlösung,
 C - die Konzentration an aufgetragenem Desoxyribonukleosid in pmol,
 R - der spezifische Referenzwert.

Es werden die Referenzwerte der 5 Desoxyribonukleoside dann in Formel (2) eingesetzt.

$$\frac{I_{\text{DNA-Hydrolysat}}}{R} = A \quad (2)$$

Es bedeuten: $I_{\text{DNA-Hydrolysat}}$ - der Integrationswert der entsprechenden Bande des DNA-Hydrolysates,
 A - der Anteil des Desoxyribonukleosids an der Gesamtmenge.

Der Wert von $d\text{Ino}$, sofern es im Elutionsdiagramm erscheint, wird, da es als desaminiertes $d\text{Ado}$ betrachtet wird, diesem Wert zugeordnet (3).

$$A_{d\text{Ino}} + A_{d\text{Ado}} = A_{d\text{Ado-Gesamt}} \quad (3)$$

Nach Addition der vier Werte kann der prozentuale Anteil jedes Einzelnen an der Gesamtmenge errechnet werden (4).

$$\begin{array}{rcl} A_{d\text{Ado}} & = & \text{Mol\% dAdo} \\ A_{d\text{Thd}} & = & \text{Mol\% dThd} \\ A_{d\text{Guo}} & = & \text{Mol\% dGuo} \\ + A_{d\text{Cyd}} & = & \text{Mol\% dCyd} \\ \hline A_{\text{Gesamt}} & & \end{array} \quad (4)$$

Die Feststellung des Basenquotienten (Q) erfolgt nach (5).

$$\frac{(\text{Mol\% dAdo} + \text{Mol\% dThd})}{(\text{Mol\% dGuo} + \text{Mol\% dCyd})} = Q \quad (5)$$

2.10 Bestimmung des 5MedCyd-Gehaltes

2.10.1 Chromatographiebedingungen

In Abwandlung von 2.9.1 wurde eine 60 x 0,18 cm Säule verwendet. Der Säulendruck betrug 1800 psi = 130 bar, welches einer Durchflußgeschwindigkeit von 13,1 cm · min⁻¹ entspricht.

2.10.2 Probenaufgabe

Es wurde 2.9.2 entsprechend vorgegangen, jedoch eine Menge von 20 µl Eichlösung auf die Säule aufgegeben.

2.10.3 Quantitative Bestimmung

Diese erfolgte mit Hilfe des Peakhöhenvergleichs zwischen einem Elutionsdiagramm mit bekanntem Gehalt an 5MedCyd (siehe Abb. 21) und dem Chromatogramm des DNA-Hydrolysates.

Dies war notwendig, da einerseits die Empfindlichkeit des verwendeten Detektors bei der Wellenlänge von 254 nm für geringe Mengen 5MedCyd nicht ausreicht, andererseits eine vollkommene Trennung der Komponenten für die Peakflächenintegration notwendig ist.

3. Ergebnisse

3.1 Basenbestimmungen

Die folgenden Abbildungen zeigen die Elutionsdiagramme, die zur Bestimmung des Basenquotienten herangezogen wurden. Jeweils vier verschiedene DNA-Hydrolysate einer DNA-Charge wurden untersucht. Die Mittelwerte für die gefundenen Basengehalte (in Mol %) und der daraus errechnete Basenquotient sind unter den Diagrammen aufgeführt.

Außerdem wurde bei der Detektion von 5MedCyd auf die entsprechende Abbildung verwiesen (Abb. 3 - 22 - 3-29).

Die Trennbedingungen sind für die Bestimmung des Basenquotienten bei Abb. 3 - 1 aufgeführt, für die Bestimmung des 5MedCyd-Gehaltes in Abb. 3 - 21.

Die Ergebnisse wurden in Tabelle 3 - 1 aufgelistet.

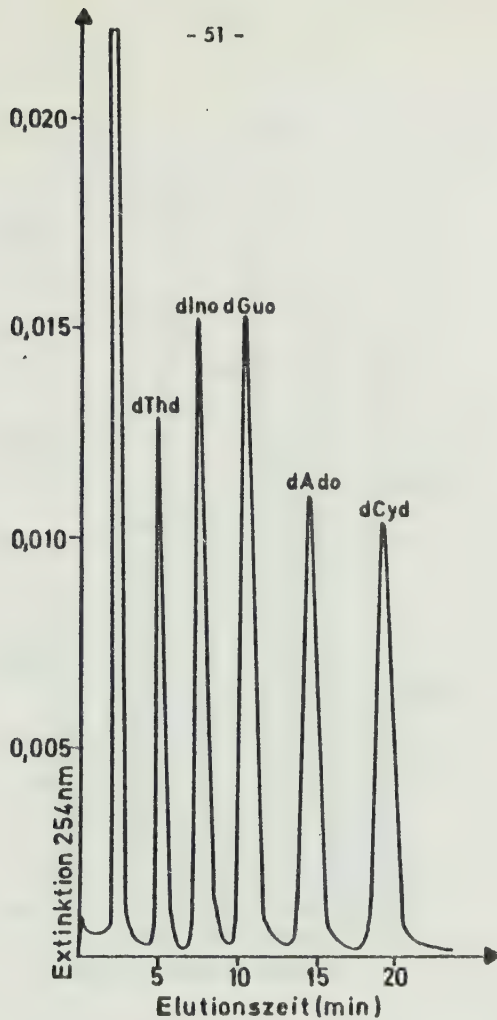


Abb. 1

Elutionsdiagramm einer synthetischen Mischung von 5 Desoxyribonukleosiden.

Trennbedingungen : Säule 40 x 0,18 cm,

Ammoniumformiatpuffer pH 4,6,

Durchflußgeschwindigkeit 8,7 cm · min⁻¹,

Druck 800 psi $\hat{=}$ 56 bar,

Säulentemperatur 55°C,

Injektionsvolumen 10 µl

Papiervorschub 10 Zoll/h.

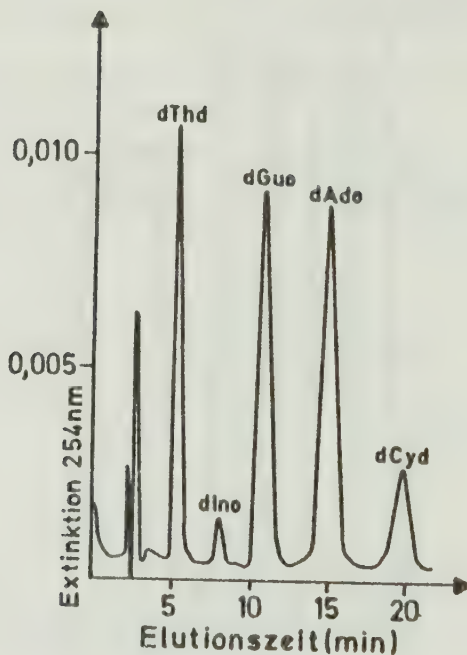


Abb. 2

Elutionsdiagramm eines Hydrolysates von *Clathrina coreacea* DNA (2.3.1)
Chromatographiebedingungen siehe Abb. 1

dAdo	27,9 Mol%	Q = 1,26
dThd	28,0 Mol%	
dGuo	21,9 Mol%	
dCyd	20,8 Mol%	
5MedCyd	1,5 Mol%	

siehe Abb. 22

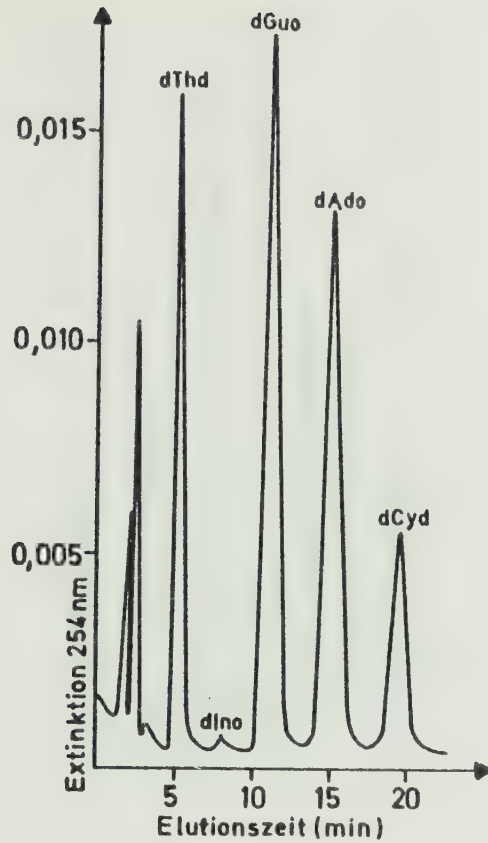


Abb. 3

Elutionsdiagramm eines Hydrolysates von *Chondrosia reniformis* DNA
(2.3.2)

Chromatographiebedingungen siehe Abb. 1

dAdo	23,2 Mol%
dThd	23,3 Mol%
dGuo	26,7 Mol%
dCyd	26,0 Mol%
5MedCyd	0,8 Mol%

$$Q = 0,87$$

siehe Abb. 23

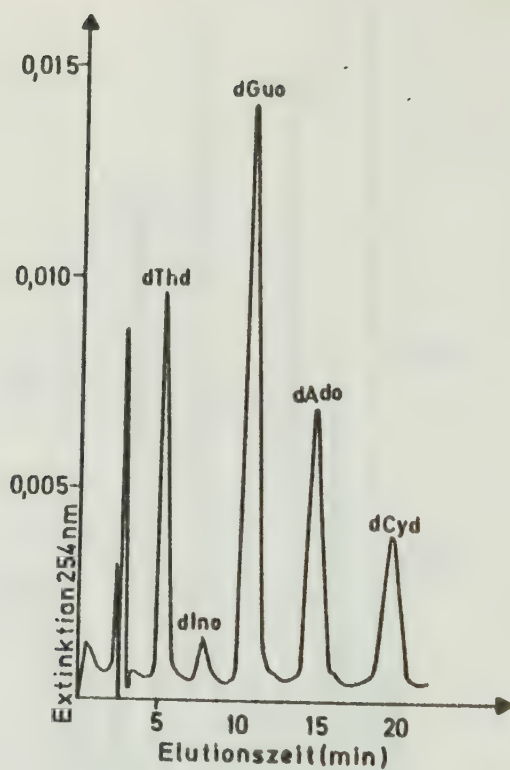


Abb. 4

Elutionsdiagramm eines Hydrolysates von *Geodia cydonium* DNA (2.3.3)
Chromatographiebedingungen siehe Abb. 1

dAdo	19,7 Mol%
dThd	19,6 Mol%
dGuo	29,8 Mol%
dCyd	30,8 Mol%
5MedCyd	-

$$Q = 0,65$$

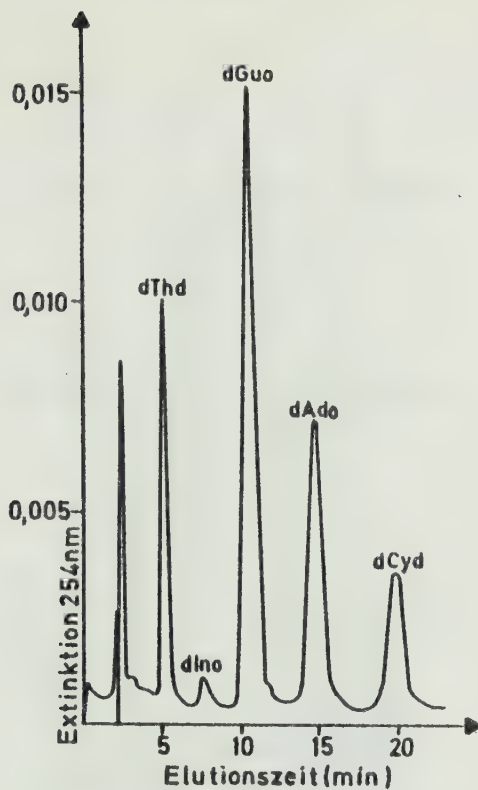


Abb. 5

Elutionsdiagramm eines Hydrolysates von *Geodia limski* DNA (2.3.4)
 Chromatographiebedingungen siehe Abb. 1

dAdo	20,1 Mol%	Q = 0,67
dThd	20,0 Mol%	
dGuo	29,6 Mol%	
dCyd	30,2 Mol%	
5MedCyd	-	

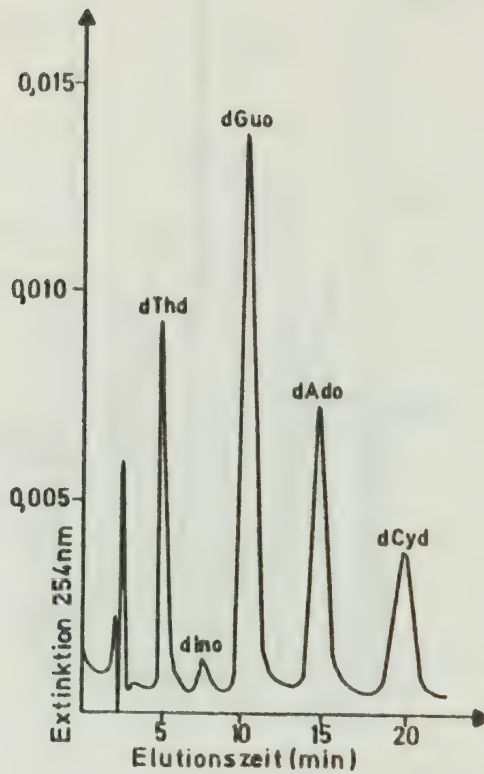


Abb. 6

Elutionsdiagramm eines Hydrolysates von *Ancorina cerebrum* DNA (2,3,5)
Chromatographiebedingungen siehe Abb. 1

dAdo 20,5 Mol%

dThd 20,3 Mol%

dGuo 29,7 Mol%

dCyd 29,5 Mol%

5MedCyd -

$$Q = 0,69$$

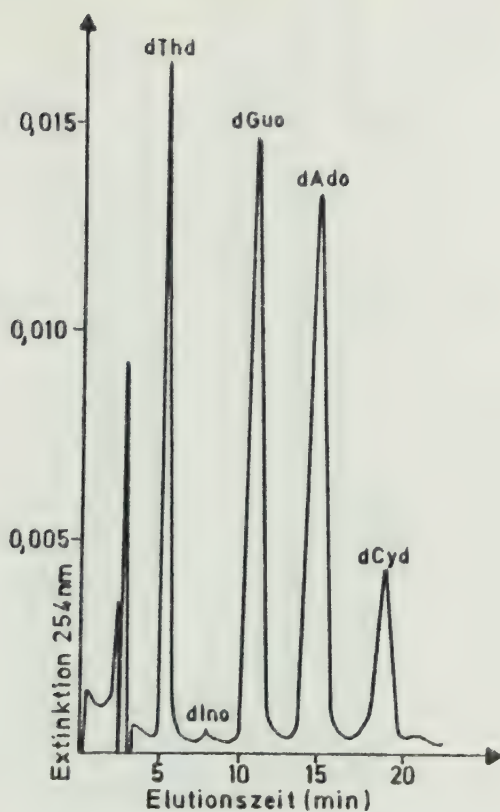


Abb. 7

Elutionsdiagramm eines Hydrolysates von *Tethya limski* DNA (2.3.6)

Chromatographiebedingungen siehe Abb. 1

dAdo	26,0 Mol%	Q = 1,09
dThd	26,2 Mol%	
dGuo	24,0 Mol%	
dCyd	22,5 Mol%	
5MedCyd	1,2 Mol%	
siehe Abb. 24		

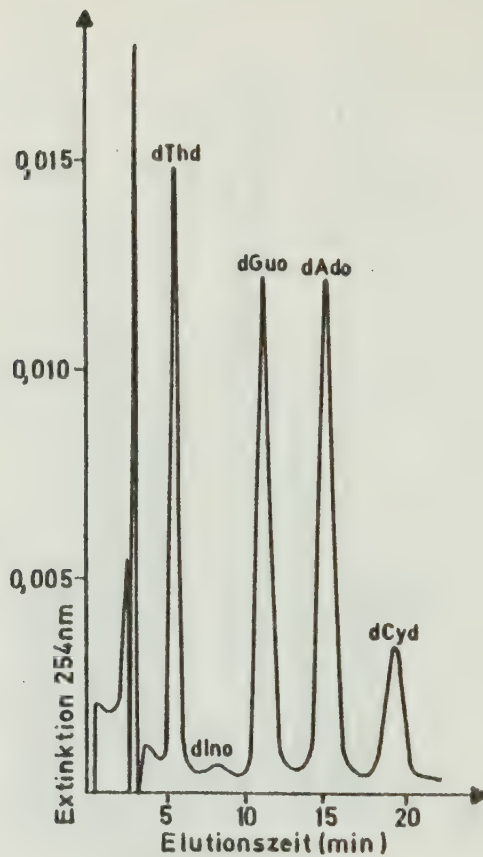


Abb. 8

Elutionsdiagramm eines Hydrolysates von *Tethya lyncurium* DNA (2.3.7)
Chromatographiebedingungen siehe Abb. 1

dAdo	27,1 Mol%	Q = 1,16
dThd	26,7 Mol%	
dGuo	23,2 Mol%	
dCyd	23,0 Mol%	
5MedCyd	-	

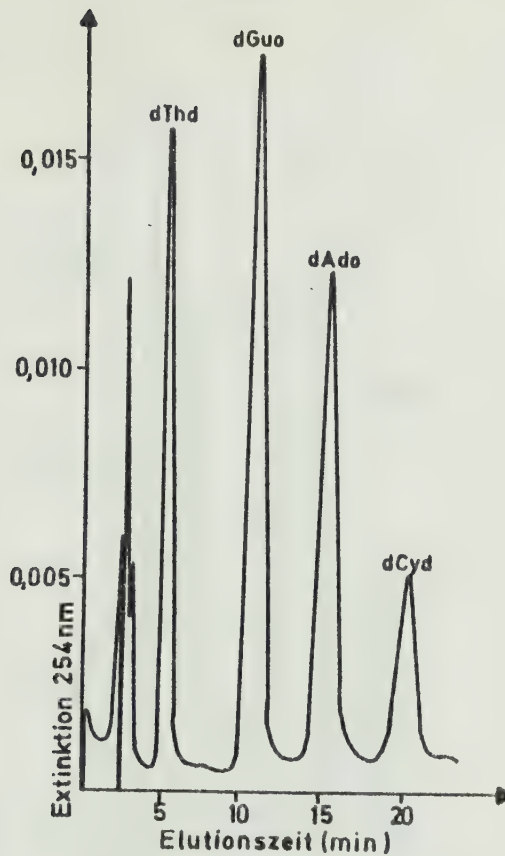


Abb. 9

Elutionsdiagramm eines Hydrolysates von *Suberites domuncula* DNA (2.3.8)
Chromatographiebedingungen siehe Abb. 1

dAdo	22,7 Mol%	Q = 0,83
dThd	22,4 Mol%	
dGuo	27,4 Mol%	
dCyd	27,2 Mol%	
5MedCyd	-	

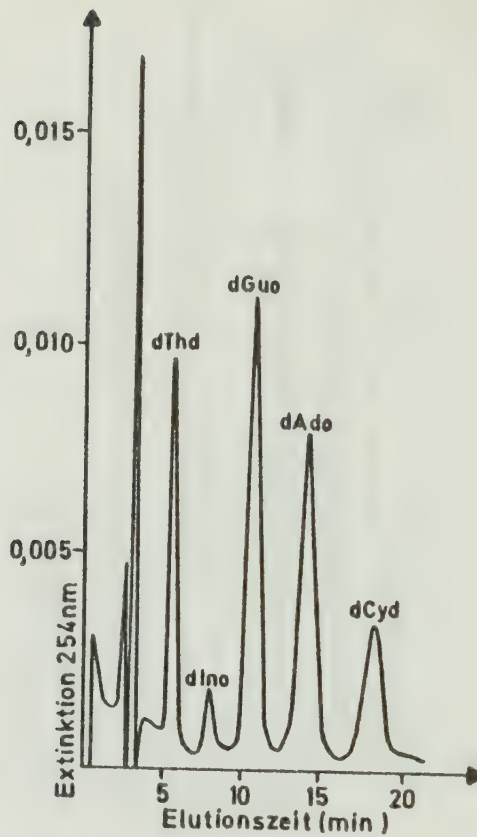


Abb. 10

Elutionsdiagramm eines Hydrolysates von *Axinella polypoides* DNA (2.3.9)
 Chromatographiebedingungen siehe Abb. 1

dAdo	25,1 Mol%	Q = 0,98
dThd	24,4 Mol%	
dGuo	24,9 Mol%	
dCyd	25,5 Mol%	
5MedCyd	-	

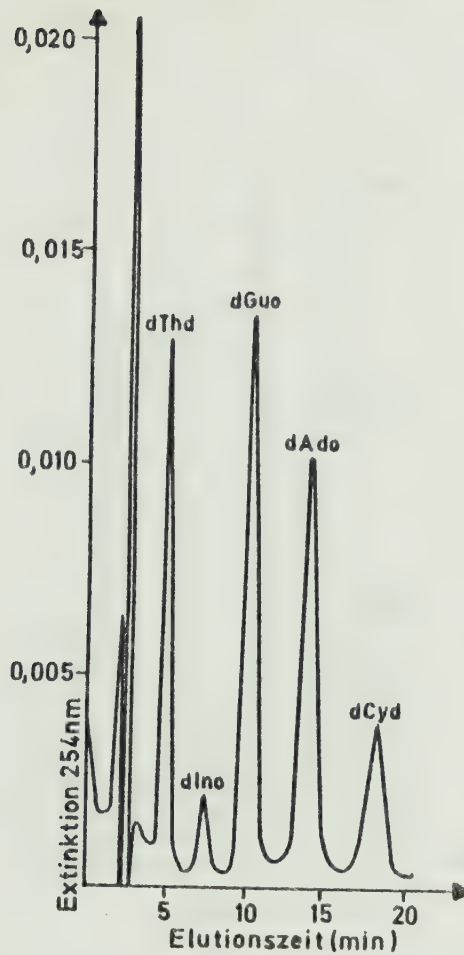


Abb. 11

Elutionsdiagramm eines Hydrolysates von Hemimyscale columella DNA (2.3.10)

Chromatographiebedingungen siehe Abb. 1

dAdo	24,9 Mol%	Q = 0,99
dThd	24,9 Mol%	
dGuo	25,0 Mol%	
dCyd	25,2 Mol%	
5MedCyd	-	

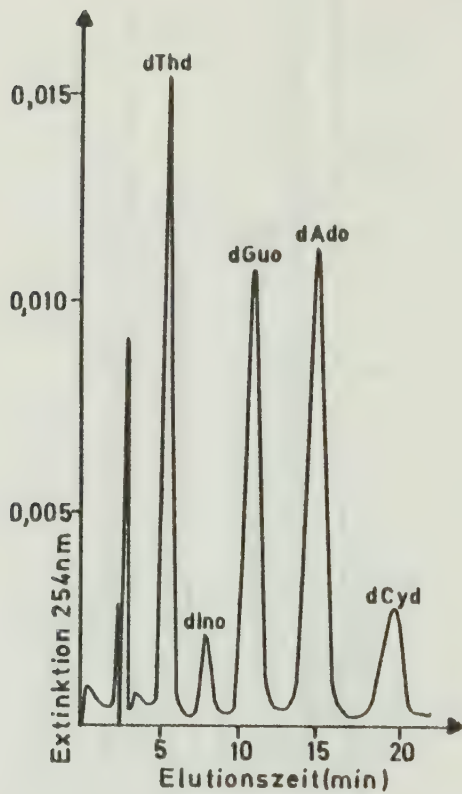


Abb. 12

Elutionsdiagramm eines Hydrolysates von *Mycale massa* DNA (2.3.11)
Chromatographiebedingungen siehe Abb. 1

dAdo	30,2 Mol%	Q = 1,49
dThd	29,5 Mol%	
dGuo	20,0 Mol%	
dCyd	18,2 Mol%	
5 MedCyd	1,9 Mol%	
siehe Abb. 25		

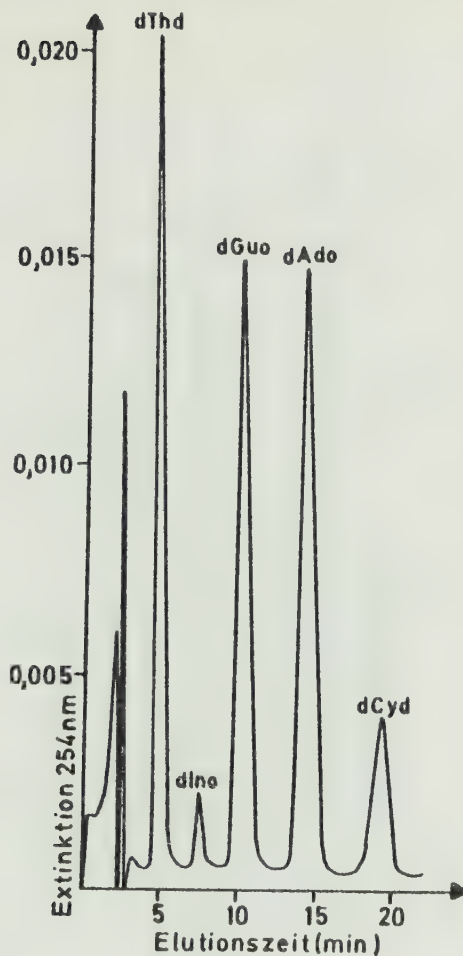


Abb. 13

Elutionsdiagramm eines Hydrolysates von *Mycale tunicata* DNA (2.3.12)

Chromatographiebedingungen siehe Abb. 1

dAdo	28,2 Mol%	Q = 1,30
dThd	28,2 Mol%	
dGuo	21,8 Mol%	
dCyd	20,2 Mol%	
5MedCyd	1,4 Mol%	

siehe Abb. 26

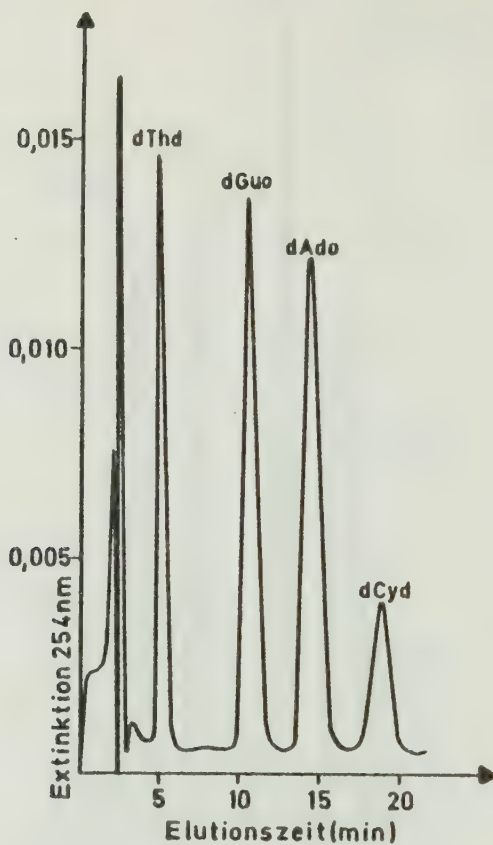


Abb. 14

Elutionsdiagramm eines Hydrolysates von *Crella rosea* DNA (2.3.13)
Chromatographiebedingungen siehe Abb. 1

dAdo	24,3 Mol%	Q = 0,93
dThd	23,8 Mol%	
dGuo	25,9 Mol%	
dCyd	23,8 Mol%	
5MedCyd	2,2 Mol%	
siehe Abb. 27		

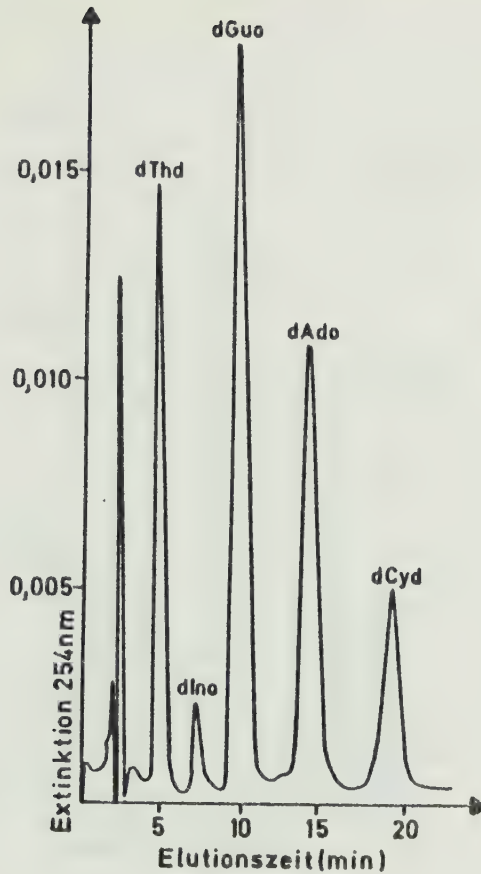


Abb. 15

Elutionsdiagramm eines Hydrolysates von *Pellina semitubulosa* DNA
(2.3.14)

Chromatographiebedingungen siehe Abb. 1

dAdo 22,4 Mol%

dThd 23,0 Mol%

dGuo 27,2 Mol%

dCyd 27,4 Mol%

5MedCyd -

Q = 0,83

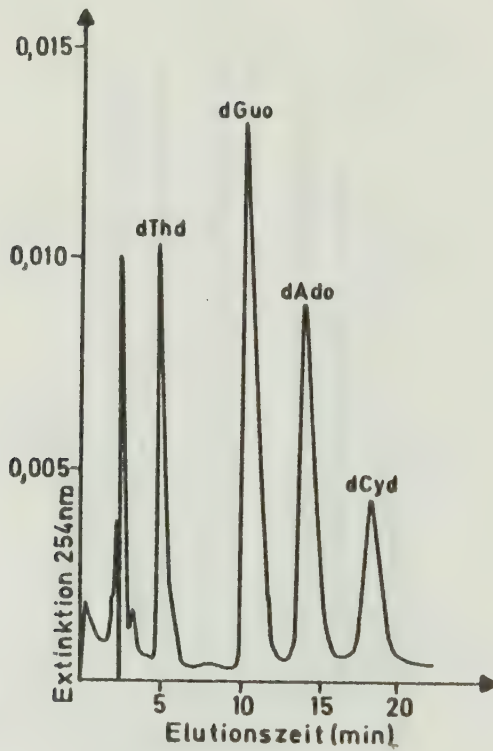


Abb. 16

Elutionsdiagramm eines Hydrolysates von *Petrosia ficiformis* DNA (2.3.15)

Chromatographiebedingungen siehe Abb. 1

dAdo	20,8 Mol%	Q = 0,70
dThd	20,3 Mol%	
dGuo	29,6 Mol%	
dCyd	29,4 Mol%	
5MedCyd	-	

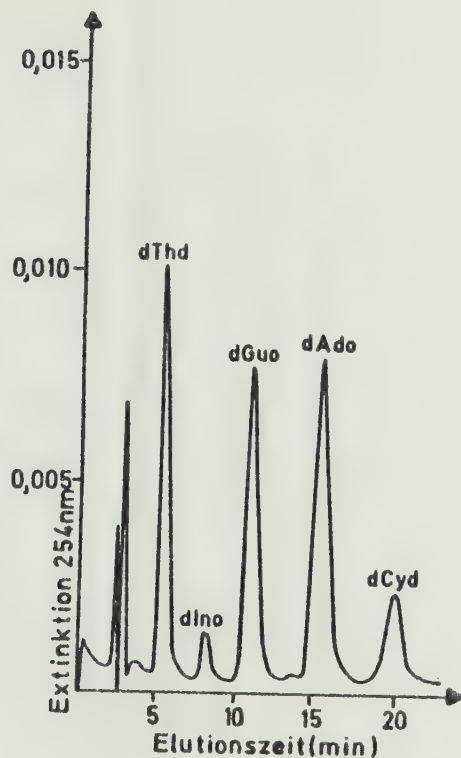


Abb. 17

Elutionsdiagramm eines Hydrolysates von *Dissidea avara* DNA (2.3.16)

Chromatographiebedingungen siehe Abb. 1

dAdo 29,4 Mol%

dThd 29,4 Mol%

dGuo 20,7 Mol%

dCyd 18,6 Mol%

5MedCyd 1,6 Mol%

$Q = 1,19$

siehe Abb. 28

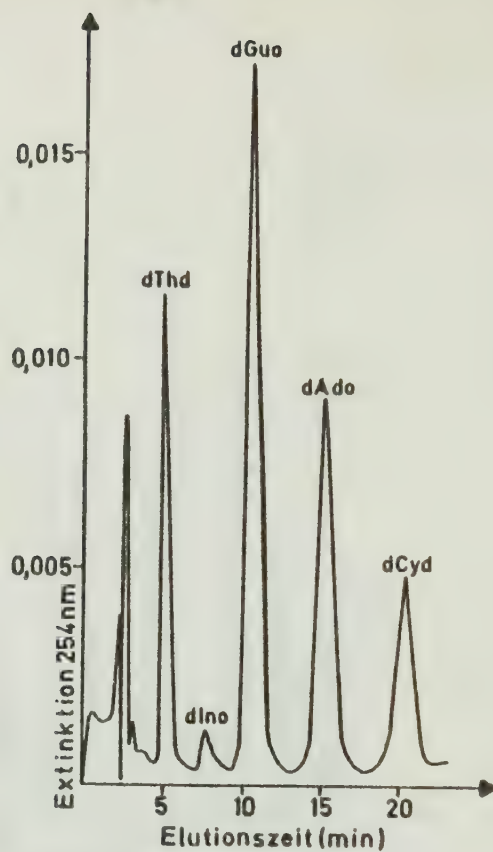


Abb. 18

Elutionsdiagramm eines Hydrolysates von *Hippospongia communis* DNA
(2.3.17)

Chromatographiebedingungen siehe Abb. 1

dAdo	19,3 Mol%	
dThd	19,2 Mol%	
dGuo	30,5 Mol%	Q = 0,63
dCyd	30,9 Mol%	
5MedCyd	-	

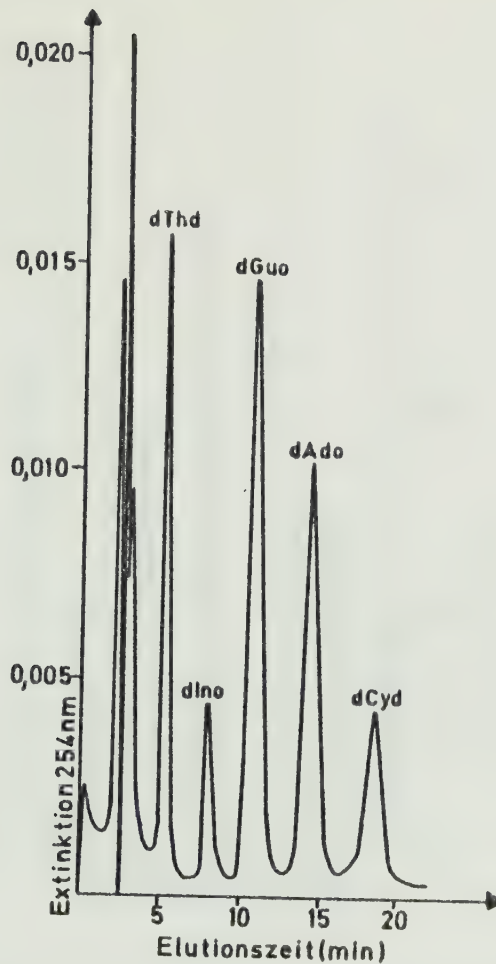


Abb. 19

Elutionsdiagramm eines Hydrolysates von *Cacospongia scalaris* DNA (2.3.18)
Chromatographiebedingungen siehe Abb. 1

dAdo	25,4 Mol%	Q = 1,04
dThd	25,5 Mol%	
dGuo	24,5 Mol%	
dCyd	23,7 Mol%	
5MedCyd	0,8 Mol%	
siehe Abb. 29		

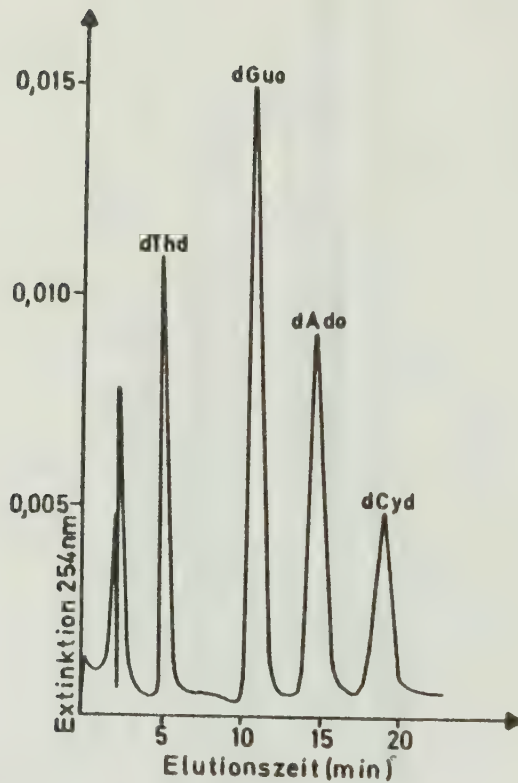


Abb. 20

Elutionsdiagramm eines Hydrolysates von *Verongia aerophoba* DNA (2.3.19)
Chromatographiebedingungen siehe Abb. 1

dAdo	20,0 Mol%	Q = 0,68
dThd	20,4 Mol%	
dGuo	29,6 Mol%	
dCyd	29,9 Mol%	
5MedCyd	-	

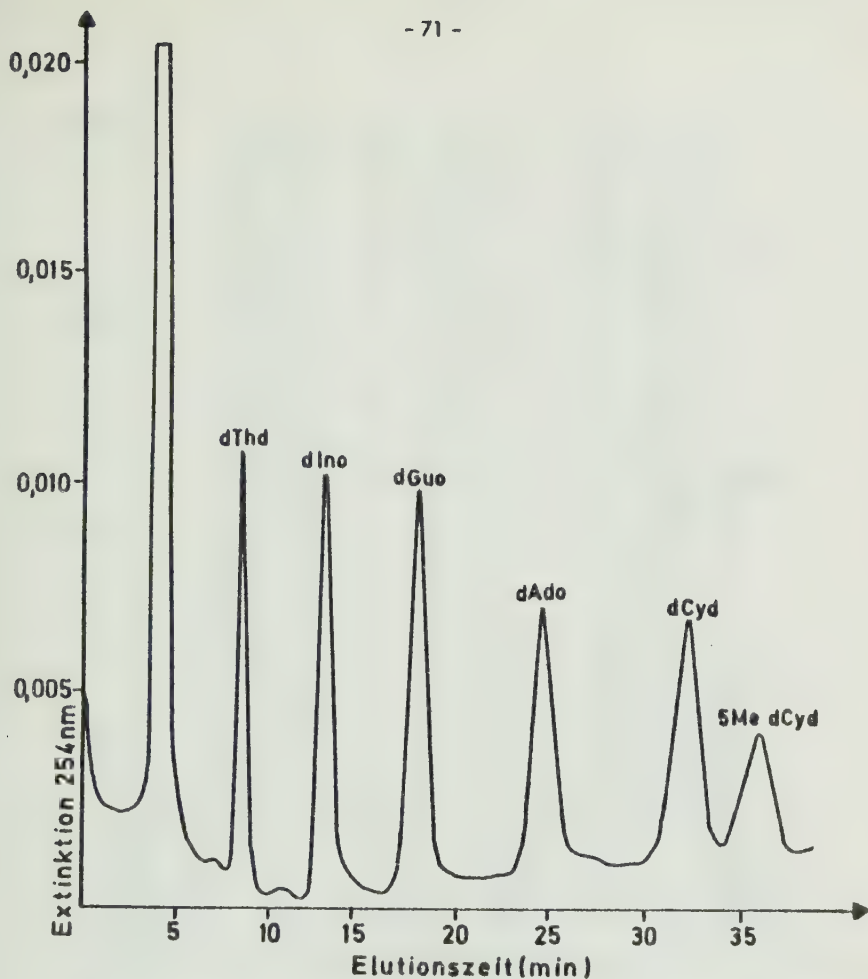


Abb. 21

Elutionsdiagramm einer synthetischen Mischung von 6 Desoxyribonukleosiden.

Trennbedingungen: Säule 60 x 0,18 cm,

Ammoniumformiatpuffer pH 4,6,

Durchflußgeschwindigkeit $13,1 \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$,

Druck 1800 psi = 130 bar,

Säulentemperatur 55°C ,

Injektionsvolumen 20 μl ,

Papiervorschub 10 Zoll/h.

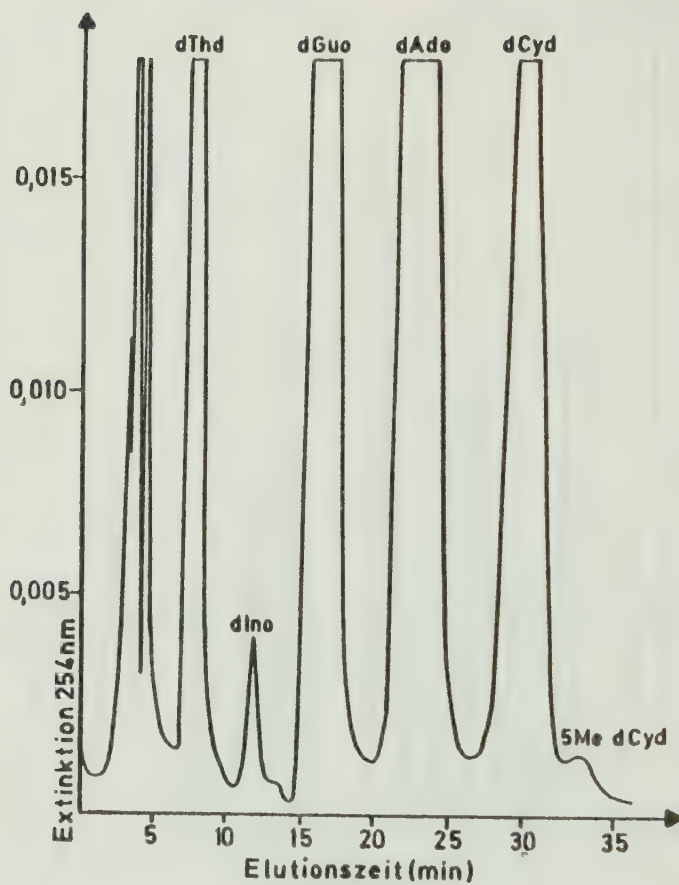


Abb. 22

Elutionsdiagramm eines Hydrolysates von *Clathrina coreacea* DNA (2.3.1)
Chromatographiebedingungen siehe Abb. 21

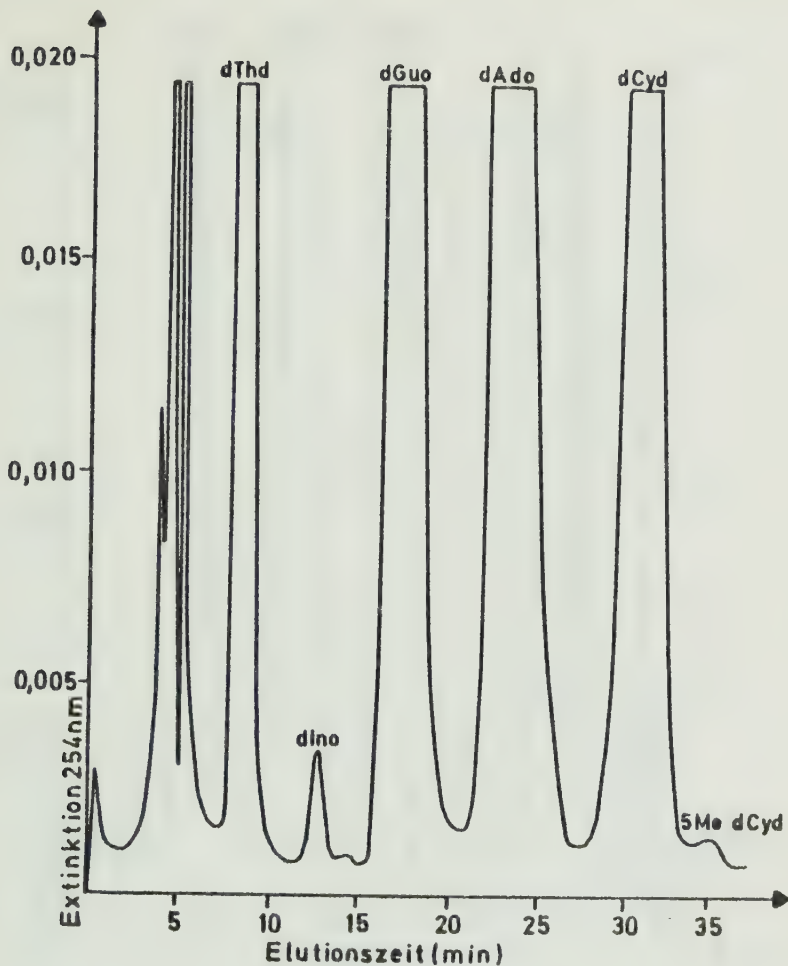


Abb. 23

Elutionsdiagramm eines Hydrolysates von *Chondrosia reniformis* DNA (2.3.2)
Chromatographiebedingungen siehe Abb. 21

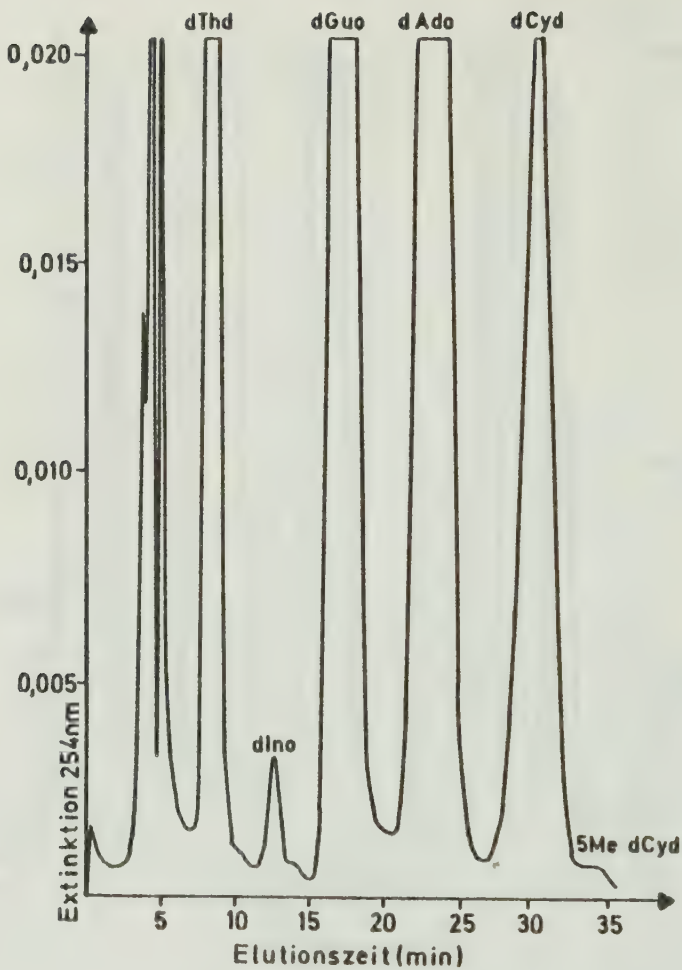


Abb. 24

Elutionsdiagramm eines Hydrolysates von *Tethya limski* DNA (2.3.6)
Chromatographiebedingungen siehe Abb. 21

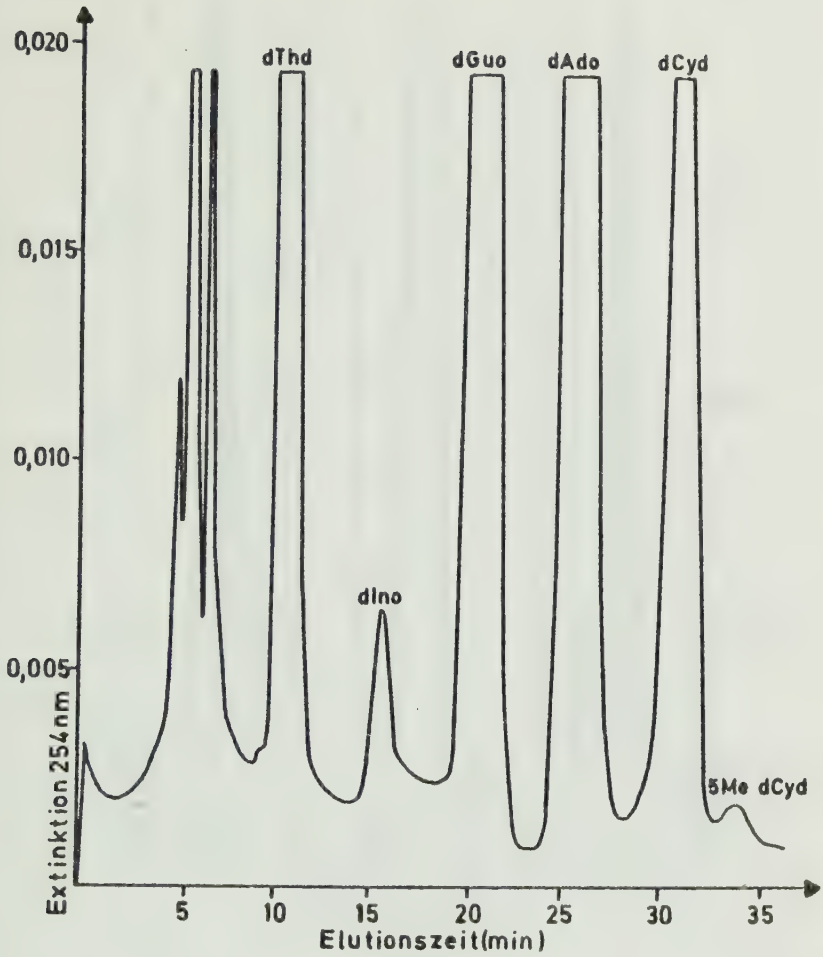


Abb. 25

Elutionsdiagramm eines Hydrolysates von *Mycale massa* DNA (2.3.11)

Chromatographiebedingungen siehe Abb. 21

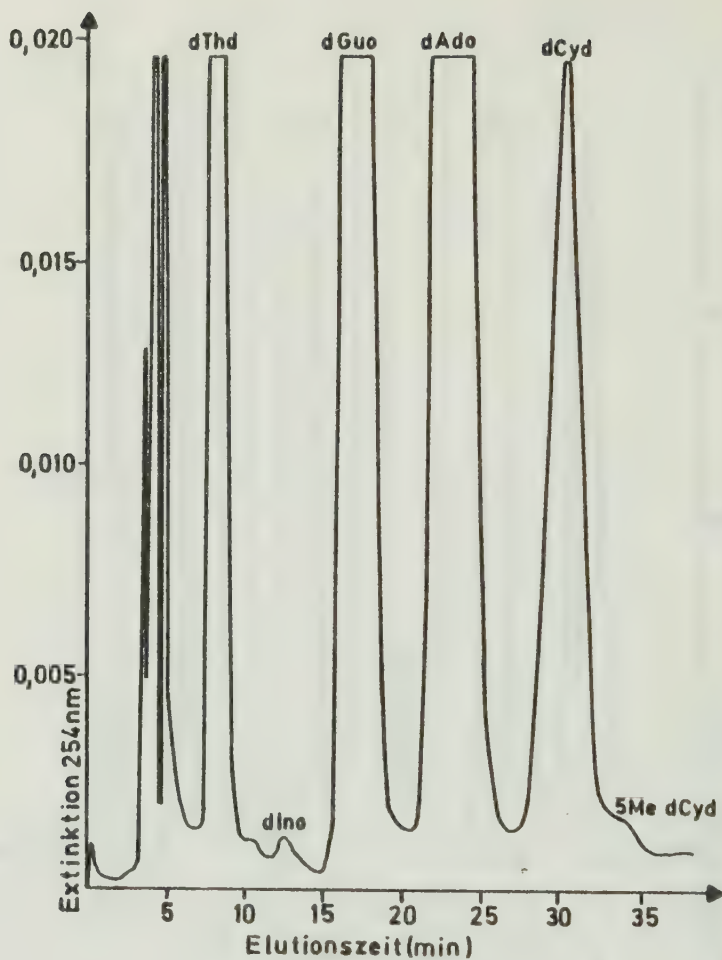


Abb. 26

Elutionsdiagramm eines Hydrolysates von *Mycale tunicata* DNA (2.3.12)
Chromatographiebedingungen siehe Abb. 21

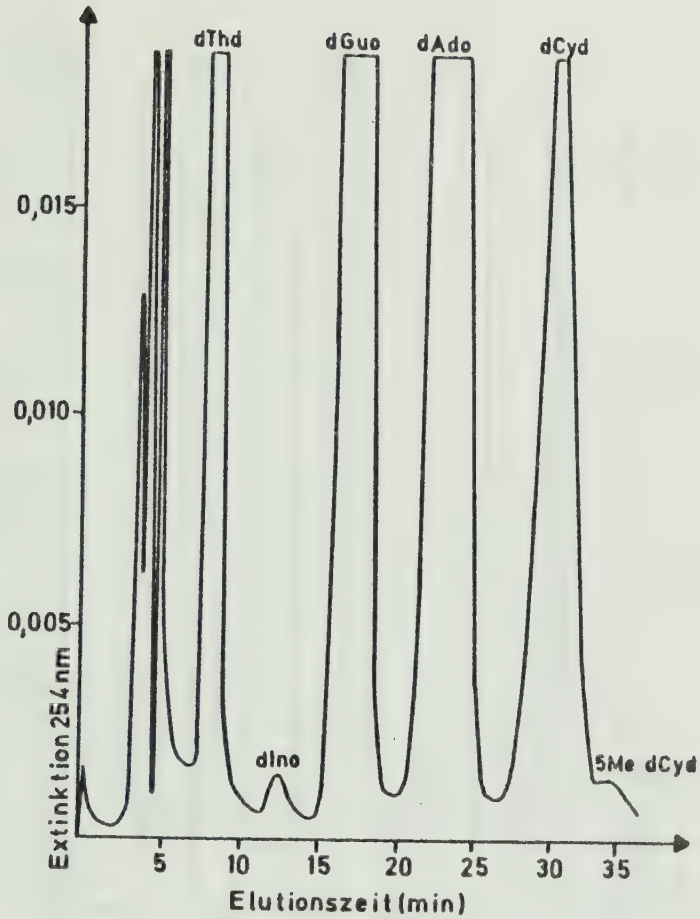


Abb. 27

Elutionsdiagramm eines Hydrolysates von *Crella rosea* DNA (2.3.13)
Chromatographiebedingungen siehe Abb. 21

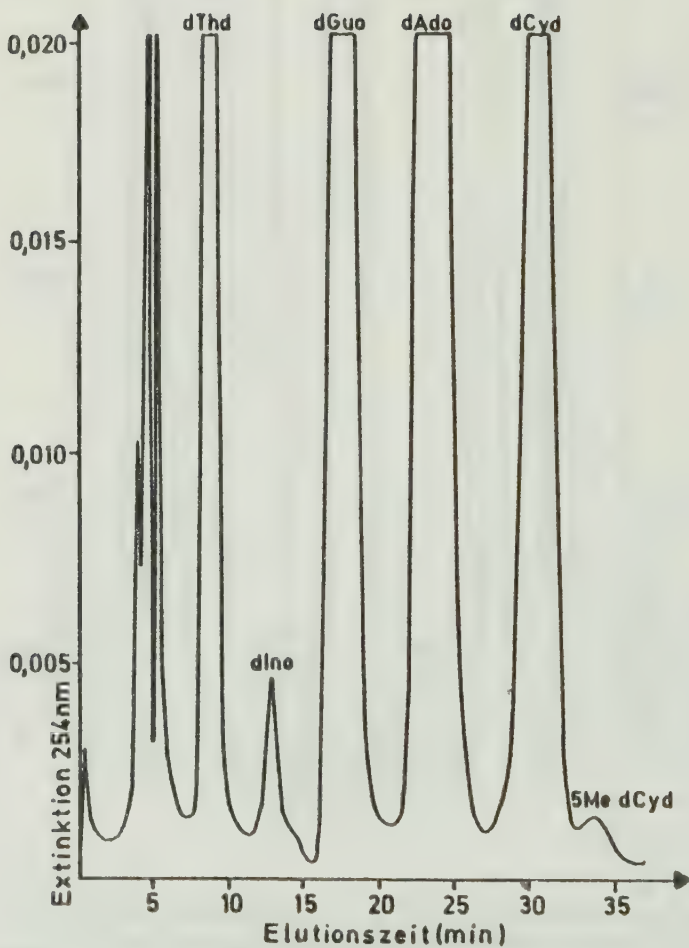


Abb. 28

Elutionsdiagramm eines Hydrolysates von *Dissidea avara* DNA (2.3.16)
Chromatographiebedingungen siehe Abb. 21

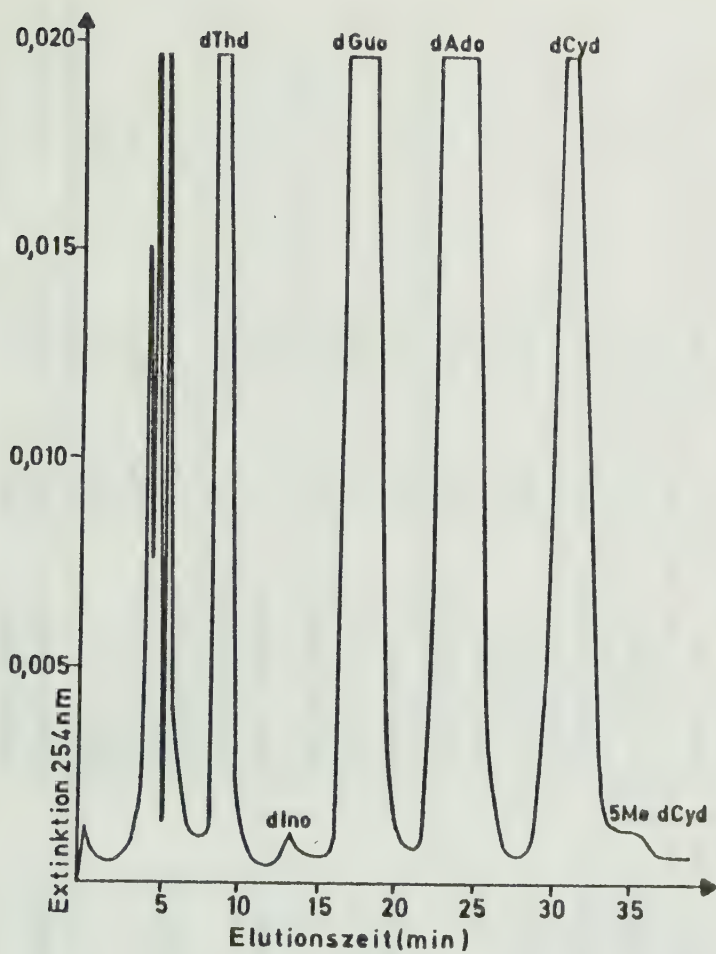


Abb. 29

Elutionsdiagramm eines Hydrolysates von *Cacospongia scalaris* DNA (2.3.18)
Chromatographiebedingungen siehe Abb. 21

Tabelle 3 - 1

Klasse	Ordnung	Gattung	Art	Q	AT (Mol %)	5MedCyd (Mol %)
Calcispongae	Homocoela	Clathrina	coreacea	1,26	55,9	1,5
Demospongiae	Homosclerophorida	Chondrosia	reniformis	0,87	46,5	0,8
	Tetractinellida	Geodia	cydonium	0,65	39,3	-
		Geodia	limski	0,67	40,1	-
		Ancorina	cerebrum	0,69	40,8	-
	Hadromerina	Tethya	limski	1,09	52,2	1,2
		Tethya	lyncurium	1,16	53,8	-
		Suberites	domuncula	0,83	45,1	-
	Halichondrina	Axinella	polypoides	0,98	49,5	-
		Hemimycale	columella	0,99	49,8	-
	Poecilosclerina	Mycale	massa	1,49	59,7	1,9
		Mycale	tunicata	1,30	56,4	1,4
		Crella	rosea	0,93	48,1	2,2
	Haplosclerina	Pellina	semitubulosa	0,83	45,4	-
		Petrosia	ficiformis	0,7	41,1	-

Klasse	Ordnung	Gattung	Art	Q	AT (Mol %)	5MedCyd (Mol %)
Demospongiae	Keratosa	Disidea	avara	1,19	58,8	1,6
		Hippospongia	communis	0,63	39,5	-
		Cacospongia	scalaris	1,04	50,9	0,8
		Verangia	aerophoba	0,68	40,4	-

3.2 Vergleich der Basenzusammensetzung von *Geodia cydonium* (2.3.3) und *Geodia limski* (2.3.4)

Es wurden die Basengehalte von sieben Hydrolysaten einer DNA-Charge ermittelt. Es fanden sich folgende Werte :

	dAdo	dThd	dGuo	dCyd
<u><i>Geodia cydonium</i>:</u>	19,7	19,6	29,0	31,6
	19,6	19,3	30,6	30,4
	19,5	20,8	29,5	30,2
	19,3	19,3	30,4	31,0
	19,8	19,4	29,8	31,0
	20,2	19,3	29,7	30,6
	<u>19,9</u>	<u>19,2</u>	<u>29,9</u>	<u>30,9</u>
Q = 0,65 $\bar{x}$	19,7	19,6	29,8	30,8
 <u><i>Geodia limski</i> :</u>	 20,4	 20,3	 29,4	 29,8
	19,5	20,7	29,4	30,2
	19,6	20,5	29,0	30,8
	20,5	19,7	29,7	30,5
	20,0	19,7	29,9	30,1
	20,1	19,8	30,1	29,9
	<u>20,3</u>	<u>19,6</u>	<u>30,1</u>	<u>30,0</u>
Q = 0,67 $\bar{x}$	20,1	20,0	29,6	30,2

Trotz einer Standardabweichung unter 1,9% für die Basenbestimmungen ist es nicht möglich eine statistisch signifikante Aussage über die Verschiedenheit der Basenzusammensetzung der Schwämme *Geodia cydonium* und *Geodia limski* zu machen.

Von ausschlaggebender Bedeutung ist ferner die Tatsache, daß von jeder Art jeweils nur eine DNA-Charge für die Untersuchung zur Verfügung stand. Möglicherweise führt jedoch eine ausgedehnte Untersuchung der Desoxyribonukleinstäuren beider Spezies mit Material, das aus jeweils mehreren verschiedenen Organismen gewonnen wurde, zu statistisch signifikanteren Unterschieden als dies in dieser Untersuchung der Fall ist.

3.3 Fehlerrechnung

Der methodische Fehler der Untersuchungsmethode wurde durch eine einfache Varianzanalyse nach Gleichung (1) für jede Base einzeln bestimmt.

$$\sum_{j=1}^k \text{SAQ}_j = \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (x_{ji} - \bar{x}_j)^2 \quad (1)$$

Es bedeuten :

- SAQ_j - Summe der Abweichungsquadrate innerhalb der Gruppen,
- x_{ji} - Basenwerte eines DNA-Hydrolysates,
- $\bar{x}_j$ - arithmetischer Mittelwert der j -ten Gruppe,
- n_j - Zahl der analysierten Proben des j -ten Schwammes,
- k - Zahl der untersuchten Schwämme.

Das MAQ innerhalb der Gruppe ist ein Schätzwert für die Varianz des Fehlers.

Es zeigt sich, daß die Fehlerbreite bei der Untersuchung der vier Hauptbasen in einem Bereich von $\pm 1,47 - \pm 1,89\%$ liegt (siehe Tabelle 3-2).

Tabelle 3 - 2 :

	Mittelwert $\bar{x}$	Restvarianz s^2	Standardabweichung s	Variationskoeffizient
dAdo	24,1	0,137	0,370	1,53 %
dThd	25,05	0,166	0,407	1,69 %
dGuo	25,81	0,143	0,379	1,47 %
dCyd	25,92	0,204	0,490	1,89 %

4 Diskussion

Die DNA fast aller Lebewesen bleibt als genetischer Informationsträger - unbeeinflusst von äußeren Einwirkungen - während der gesamten Lebensdauer eines Organismus konstant.

Dieses Phänomen wurde auch von einer Arbeitsgruppe unseres Instituts bei der Erforschung von Pollutionen im maritimen Bereich erneut bestätigt (99). Bei den Untersuchungen wurden die Reaktionen des Schwammes *Geodia cydonium* auf molekularer Ebene zum Indikator für die Umweltverschmutzung herangezogen. Es zeigte sich, daß durch eine starke Verschmutzung des Meerwassers - angezeigt durch sehr hohe Phosphat- und Stickstoffkonzentrationen - zwar eine Verringerung der Protein- und RNA-Gehalte des Schwammes hervorgerufen wurde, daß jedoch der DNA-Gehalt des Schwammes unverändert blieb.

Vor diesem Hintergrund erschien die Einbeziehung der DNA-Zusammensetzung als brauchbares Mittel zur Stützung taxonomischer Untersuchungen, wie dies durch Bak (7) bereits für Mikroorganismen geschehen ist.

Im Rahmen ihrer Arbeiten über programmierte Synthese beschäftigt sich eine Gruppe unseres Instituts mit der Gewinnung und Charakterisierung von Desoxyribonukleinsäuren (DNA) unterschiedlicher Herkunft. So wurden neben den DNAs höherer Lebewesen (Forelle, Hering, Mensch) auch diejenigen niederer Meeresorganismen (Plankton, Schwämme, Arthropoden) für vielfältige Verwendung dargestellt und in einer DNA-Bank zusammengefaßt. Die Schwamm-DNAs sollten außer zu Hybridisierungsexperimenten auch zur Taxonomie dieser Organismen verwendet werden.

Die schematische Klassifizierung von Schwämmen wird bisher an Hand von äußeren Merkmalen wie Habitus, Skelett und Makro- und Mikroskleren durchgeführt. Die Morphologie von Schwämmen ist jedoch oft auch innerhalb der gleichen Art sehr verschieden, was die einwandfreie Klassifizierung erheblich erschwert. In der Entwicklung vieler dieser Organismen, z.B. der wichtigen Filtrierschwämme, werden außerdem, ebenso wie bei vielen anderen Meeresorganismen, freischwimmende Entwicklungsstufen durchschritten, die in ihrer ontogenetischen Entwicklung verschiedene Stadien sehr schnell durchlaufen.

Dadurch sind ihre Immunotypen und besonders ihre Morphologie stark wechselnd und oft schlecht charakterisierbar.

Um wenigstens ein konstantes Merkmal jeder Schwammfamilie reproduzierbar zu erfassen, haben wir erstmals Vertreter fast aller Schwammfamilien auf die Zusammensetzung ihrer DNA untersucht.

Zur Bestimmung der Basenquotienten mußte zunächst ein routinemäßig anwendbares Verfahren aus den in der Literatur beschriebenen ausgewählt werden.

Ursprünglich wurden DNA-Basenbestimmungen nach Säurehydrolyse (54,93) des Materials mit Hilfe der Papier- (92) oder Dünnschichtchromatographie (83) durchgeführt. Diese Verfahren wiesen jedoch einige Nachteile auf. So wird z.B. durch Säurehydrolyse 5-Hydroxymethylcytosin fast vollständig zerstört (54); Desaminierungs- und Demethylierungsprozesse während Säurehydrolysen werden diskutiert (44). Die Basenanalysen sind dabei zwar recht genau, aber zeitraubend und umständlich. Die Empfindlichkeit liegt zudem weit unter der neuerer Methoden, wie z.B. der Gaschromatographie.

Wir entschlossen uns daher, um eventuelle Nachteile einer Säurehydrolyse zu vermeiden, die DNA enzymatisch zu hydrolysieren, eine Methode, die in ihren Grundlagen auf die Arbeiten von Araki (5), Klein (42) und Schmidt (74) zurückgeführt werden kann.

Durch die Verwendung von Enzymen ist ein problemloser Abbau der DNA bis hin zu den Desoxyribonukleosiden möglich. Dabei können Oligodesoxyribonukleotide sowohl mit Milz- als auch mit Schlangengiftphosphodiesterase hydrolysiert werden, da die zunächst entstehenden Isomeren, 3'- und 5'-Mononukleotide, durch anschließende Umsetzung mit alkalischer Phosphatase zu uniformen Desoxyribonukleosiden abgebaut werden.

Die Trennung enzymatisch hydrolysierter DNA auf der Ebene der Desoxyribonukleotide an Ionenaustauschern ist von Cohn (20) beschrieben worden. Dabei konnte eine größere Empfindlichkeit erzielt werden, insbesondere im Vergleich zu Papier- und Dünnschichtchromatographie. Dies beruht auf einer besseren Auftrennung der DNA-Komponenten und der Einführung empfindlicher Spektralphotometer, die gleichzeitig eine Identifizierung und Quantisierung der Mononukleotide aufgrund ihres unterschiedlichen Absorptionsverhaltens im ultravioletten Licht erlauben (20).

Basierend auf den Arbeiten von Cohn (20) erfolgte in den letzten 20 Jahren eine Verbesserung der heute als "konventionell" bezeichneten Säulenchromatographie, die in der Entwicklung eines zunächst speziell für die Nukleinsäureanalytik bestimmten Systems, der Hochdruckflüssigchromatographie, endete (3,33,38,87).

Hierbei werden durch Verwendung von Ionenaustauschern geringer Partikelgröße (kleiner als $10\text{ }\mu\text{m}$), geringen Säulendurchmessern und von Präzisionshochdruckpumpen mit konstanter Förderleistung zur Überwindung des hohen Druckabfalls in der Säule hohe Auflösung der Trennungen bei bisher ungekannt kurzen Trennzeiten erzielt.

So können einige Vorteile von Gaschromatographie und konventioneller Säulenchromatographie vereinigt werden, und auf Grund beeindruckender Vorteile gegenüber der Gaschromatographie schien uns dieses Verfahren am besten zur Durchführung der Basenbestimmungen geeignet.

Zwar ist die Gaschromatographie ebenfalls im Bereiche der Nukleinsäureanalytik anwendbar und ein sehr empfindliches Verfahren (15), erfordert jedoch die Überführung der zu untersuchenden Substanzen in den gasförmigen Zustand, was oft eine vorherige Derivatisierung, z.B. zum Silylderivat, notwendig macht. Dies ist bei der HPLC überflüssig, da ein weites Spektrum von flüssigen mobilen Phasen zur Verfügung steht. Nach vorsichtigen Schätzungen (82) können nur 20% aller bekannten organischen Verbindungen mit Hilfe gaschromatographischer Verfahren aufgetrennt und analysiert werden.

Ein Vorteil der HPLC gegenüber der Gaschromatographie liegt neben der größeren Effektivität des HPLC-Trennsystems und einer besseren Auflösung benachbarter Banden (15) in der größeren Variationsbreite bei der Änderung der Trennbedingungen. So können bei der Hochdruckflüssigchromatographie wie in gaschromatographischen Verfahren nicht nur die stationäre Phase, die Durchflußrate und die Temperatur geändert werden, sondern es besteht auch die Möglichkeit einer breiten Variation in der Zusammensetzung der mobilen Phase.

Weiter besteht die Möglichkeit, Trennungen mit Hilfe einer Gradientenelution durchzuführen.

Neben einem optimalen Bestimmungsverfahren zur Ermittlung der Basenzusammensetzung der Schwamm-DNAs mußten möglichst schonende Präparations-, Reinigungs- und Hydrolyseverfahren angewendet werden.

Die DNA-Präparation wurde nach Hönig et al. (32) durchgeführt. Bei dieser Methode wird Cetyltrimethylammoniumbromid (CtMe_3NBr) als fällendes Agens verwendet. In zwei Arbeitsschritten werden dabei Verunreinigungen nahezu völlig abgetrennt. Die Ausbeute an DNA ist relativ hoch und beträgt 30% der Ausgangsmenge. Verunreinigungen mit Proteinen betragen ca. 0,3% und sind ebenso wie die mit RNA, die bei etwa 0,2% liegen, relativ unbedeutend. Diese Werte sind denen anderer Verfahren durchaus vergleichbar, teilweise übertreffen sie diese (32).

Da die beim Abbau der DNA aus verbliebenen RNA-Verunreinigungen durch Phosphodiesterase ebenfalls freigesetzten Ribonukleoside im Trennsystem mit den Desoxyribonukleosiden interferieren, können selbst geringste RNA-Verunreinigungen das Ergebnis der Desoxyribonukleosidbestimmungen verfälschen.

Aus diesem Grunde wurden die nach der Fällung mit CtMe_3NBr bereits relativ sauberen DNA-Chargen einem weiteren Reinigungsschritt durch CsCl -Dichte-zentrifugation unterzogen, die in Anlehnung an die Methode von Mammur (49) durchgeführt wurde. Dieses Trennverfahren von Substanzen mit Hilfe ihrer unterschiedlichen Sedimentation im Dichtegradienten der Ultrazentrifuge ist für DNA in höchstem Maße schonend, da die Moleküle hierbei keinen denaturierenden chemischen und physikalischen Einwirkungen ausgesetzt sind. Dieses Verfahren ist weiterhin vorteilhaft, da es nicht nur die Abtrennung verbliebener RNA auf Grund ihrer höheren spezifischen Dichte erlaubt, sondern auch die einsträngiger, denaturierter DNA, da diese ebenfalls eine höhere Dichte als native Doppelstrang-DNA aufweist (84).

Die enzymatische Hydrolyse der CsCl -gradientengereinigten DNA erfolgte in Anlehnung an ein von Breter und Zahn (14) verwendetes Verfahren. Neben der schnellen Durchführbarkeit ist von Bedeutung, daß keine aufwendige technische Ausstattung erforderlich ist.

Die Bildung von dIno aus dAdo durch Verunreinigung der alkalischen Phosphatase mit Adenosindesaminase kann den Bestimmungsgang komplizieren. Das verwendete Trennsystem ermöglicht jedoch die Abtrennung der dIno-Fraktion von den anderen Desoxyribonukleosiden und ihre quantitative Bestimmung. Es sei jedoch betont, daß

bei Verwendung hochgereinigter Enzympräparationen, deren Verunreinigung mit Adenosindesaminase vernachlässigbar ist, die Bildung von dIno bei kurzen Hydrolysezeiten nahezu ganz verhindert werden kann.

Breter und Zahn (14) trennten die Desoxyribonukleoside dAdo, dCyd, dGuo, dThd und dIno auf einer 30 cm langen Säule. Die quantitative Analyse war dabei nach 18 min abgeschlossen. Wir verwendeten eine um 10 cm verlängerte Trennsäule, die eine Verbesserung der Trennung zwischen Ausschlußvolumen und nachfolgender dThd-Fraktion ebenso erlaubte wie eine bessere Abtrennung der dIno-Fraktion vom dGuo-Gipfel. Quantitative Analysen waren dabei nach 22 min abgeschlossen. Die Vorteile dieses Vorgehens lagen in einer weiteren Verbesserung der Genauigkeit der Bestimmungen, wenn dies auch mit einer Verlängerung der Trennzeit um 4 min erkauft werden mußte. Eine Analysendauer von 22 min erscheint jedoch auch für schnelle routinemäßige Untersuchungen durchaus vertretbar.

Als stationäre Phase wurde ein stark saurer Kationenaustauscher verwendet, der aus sulfoniertem Styrocopolymer mit einer Partikelgröße von 10-12 μ m besteht. Austauscher dieser Art wurden von Uziel et al. (87) mit guten Ergebnissen für die Trennung von Ribonukleosiden in die Analyse von Nukleinsäurebausteinen eingeführt.

Wir bevorzugten diesen Austauscher konventioneller Art gegenüber einem "pellicular resin", da die Trennung von dThd vom Ausschlußvolumen mit den "pellicular resins" nur unvollständig erfolgte (14), was einerseits auf die geringe Austauschkapazität, andererseits auf die nur schwach saure Austauschermatrix zurückgeführt werden könnte. Stark saure Kationenaustauscher vom "pellicular type" waren im Handel nicht erhältlich. Deshalb konnten die Vorteile eines nur geringen Druckabfalles in der Säule und eines ausgesprochen geringen Verlustes an Auflösung bei längerer (mehrere Monate dauernder) Verwendung des "pellicular resins" nicht zum Tragen kommen.

Die Trennsäulen wurden entsprechend einem Verfahren von Scott und Lee (77) in Abständen von mehreren Tagen gepackt, da sich, abweichend von den Befunden von Breter und Zahn (14), die Präzision der Trennungen und der quantitativen Bestimmungen erst nach etwa 50 Chromatographieläufen merklich verringerte. Diese

Befunde decken sich mit Angaben, die mittlerweile auch von anderen Autoren mitgeteilt wurden (12).

Als Elutionsmittel diente ein 0,4 molarer Ammoniumformiatpuffer, pH 4,6. Dieses Eluens wurde von Uziel et al. (87) in die chromatographische Analyse auf Kationenaustauschern eingeführt. Durch diese flüssige Phase wird der starke korrosive Effekt der konzentrierten HCl-Lösungen (19), wie sie an Anionenaustauschern zur Trennung von Desoxyribonukleotiden verwendet werden, auf die Geräte (Pumpen, Dichtungen, Säulen) vermieden. Allerdings berichten einige Autoren (12) auch von korrosiven Einflüssen der zum Teil freien Ameisensäure insbesondere auf Pumpenköpfe und Stahlkapillaren. Zudem ist eine Beeinträchtigung des Probenmaterials, die durch Einwirkung starker Säure möglich ist, bei Verwendung dieses Elutionsmittels stark vermindert (87). Die Molarität des Puffersystems muß in sehr engen Grenzen konstant reproduziert werden, da sie einen ausgesprochenen Effekt auf die Elutionsvolumina der Desoxyribonukleoside ausübt. Bei zu hohen Werten ist eine ausreichende Auflösung, insbesondere des dGuo-dAdo-Paares, nicht mehr gegeben, bei zu niedrigen Werten nehmen Trenndauer und Bandenverbreiterung stark zu.

Die Trennungen wurden bei einer Säulentemperatur von 55°C durchgeführt, da sich zeigte (14), daß bei höheren Temperaturen die dAdo-Fraktion nicht ausreichend von der vorlaufenden dGuo-Fraktion abgetrennt wird. Bei niedrigeren Temperaturen stieg hingegen bei guter Auflösung die Trenndauer auf ein unververtretbares Maß an (z.B. von 18 auf 23 min bei Verwendung einer 30 cm Säule).

Um eine Durchflußgeschwindigkeit von $8,7 \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$ aufrecht zu erhalten, mußte die Säulenpumpe einen Druck von 800 psi überwinden. Dieser Wert konnte durch das verwendete Gerät erbracht werden, so daß keinerlei Überbeanspruchung der technischen Ausrüstung eintritt.

Zur Basenbestimmung der DNA-Chargen wurden Hydrolysatvolumina zwischen 2 und 20 µl injiziert. Diese enthielten Desoxyribonukleoside in etwa gleicher Menge wie die zuvor zu Eichzwecken verwendeten synthetischen Desoxyribonukleosid-Gemische. Dadurch wurden Fehlerquellen, die eventuell auf unterschiedliche Beladung des Trennsystems zurückzuführen sind, verhindert.

Die quantitativen Bestimmungen der Desoxyribonukleosidgehalte der Proben wurden mit Hilfe digitaler Peakflächenintegration durchgeführt. Brown (15) bezeichnet diese Methode als die schnellste und einfachste, die nicht von der Sorgfalt und dem Geschick des Auswerters abhängig ist, weil sie mit Hilfe eines automatischen Integrators arbeitet. Die Ergebnisse dieser Methode sind ausgezeichnet (15), wenn die Grundlinie des Chromatogramms, wie es in den vorliegenden Untersuchungen der Fall war, konstant bleibt und eine gute Trennung aller Komponenten erzielt wird.

Zur Bestimmung der Fehlerbreite des Bestimmungsverfahrens wurde eine einfache Varianzanalyse durchgeführt. Die Werte für die Standardabweichung, s , variieren bei der Bestimmung der Desoxyribonukleoside dAdo, dCyd, dGuo und dThd in einem Bereich von 0,37 - 0,49. Dies entspricht einem Variationskoeffizienten von 1,47 - 1,89%. Diese Werte verdeutlichen die hohe Reproduzierbarkeit des Bestimmungsverfahrens. Im Vergleich hierzu berichteten Breter und Zahn (14) für Bestimmungen auf 30 cm Säulen lediglich Variationskoeffizienten bis zu 3,6%.

Um die Abtrennung des 5MedCyd von der dCyd-Fraktion zu erreichen, verwendeten wir eine 60 cm lange Trennsäule. Um akzeptable Durchflußraten von $0,3 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ zu erreichen, mußte eine Erhöhung des Druckabfalls in der Säule auf wenig mehr als 1800 psi in Kauf genommen werden. Dieser Gegendruck liegt noch innerhalb der Leistungsbreite des Systems und kann ohne Überbeanspruchung der Pumpe aufgebracht werden. Eine Durchflußgeschwindigkeit von $13,1 \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$ stellt einen Kompromiß dar zwischen der dabei erreichten Auflösung und der Trenndauer. Es gelang, 5MedCyd in solchem Umfang von der dCyd-Fraktion abzutrennen, daß zumindest eine semiquantitative Bestimmung des 5MedCyd-Gehaltes durchgeführt werden konnte. Diese Form der quantitativen Bestimmung mit Hilfe der Peakhöhenmessung wurde gewählt, da die Peakflächenintegration nur dann zu reproduzierbaren Ergebnissen führt, wenn eine vollständige Trennung der beiden Komponenten erreicht wird (15). Dies war im vorliegenden Fall nicht möglich ohne eine zu große Trenndauer.

Ein Verfahren zur Bestimmung des 5MC-Gehaltes von DNA wurde kürzlich von Breter et al. (13) beschrieben. Es ist dabei möglich, den 5MC-Gehalt bis hinab zu einem Wert von 0,3 Mol% sicher zu bestimmen. Bei Werten unter 1 Mol% war im vorliegenden Falle zumindest eine Ja-Nein Entscheidung möglich.

Im Verlauf unserer Untersuchungen zeigten sich deutliche Schwankungen der Basenquotienten der analysierten Schwämme. Der Basenquotient des AT-reichsten Schwammes, *Mycale massa* (2.3.11), betrug 1,49, entsprechend einem AT-Gehalt von 59,7 Mol%. Der niedrigste AT-Gehalt von 38,6 Mol% wurde in der DNA des Schwammes *Hippospongia communis* (2.3.17) nachgewiesen. Der Basenquotient errechnet sich hier zu 0,63.

Betrachtet man diese Variationsbreite, so sind die Schwämme in Bezug auf ihren Basenquotienten in etwa dem Bereich der Wirbellosen zuzuordnen. Die Grenzen sind hier mit einer Spanne von 1,7 - 0,6 nahezu identisch.

Auch innerhalb der verschiedenen Ordnungen konnten bei den untersuchten Schwämmen relativ große Unterschiede des Basenquotienten der DNA festgestellt werden, so z.B. bei *Hadromerina* in einem Bereich von 1,16 - 0,83 und bei *Keratosia* von 1,08 - 0,63.

Bei 8 von 19 untersuchten Schwämmen konnte 5MC nachgewiesen werden. Der Anteil schwankte dabei von 2,2 Mol% bei *Crella rosea* (2.3.13) bis zu 0,8 Mol% bei *Chondrosia reniformis* (2.3.2) und *Cacospongia scalaris* (2.3.18).

Ein uniformes Vorkommen von 5MC war lediglich bei der Ordnung der *Poecilosclerina* festzustellen. Alle drei untersuchten Schwämme dieser Ordnung, *Mycale massa* (2.3.11), *Mycale tunicata* (2.3.12) und *Crella rosea* (2.3.13) wiesen einen relativ hohen 5MC-Anteil auf, der in einem Bereich von 2,2 - 1,4 Mol% lag.

In den Ordnungen *Tetractinellida*, *Halichondrina* und *Haplosclerina*, die alle zur Klasse der *Demospongiae* gehören, konnte 5MC in den untersuchten DNAs nicht nachgewiesen werden.

Die gefundenen Werte für 5MC ermöglichen die Einordnung der Schwämme zwischen Pflanzen mit einem 5MC-Gehalt ihrer DNA von 4 - 7 Mol% (78) und Wirbeltieren, wie z.B. den Mäusen, mit einem 5MC-Gehalt von 1,5 Mol% (72).

Ein interessantes Problem stellte die Erfassung möglicher Unterschiede in der DNA-Basenzusammensetzung der Schwämme *Geodia cydonium* (2.3.3) und *Geodia limski* (2.3.4) dar. Im Rahmen von Untersuchungen einer Arbeitsgruppe unseres Instituts

hatten sich geringe Unterschiede im Verhalten beider Schwamm-DNAs im Dichtegradienten der Ultrazentrifuge gezeigt, bei fast völliger Identität der Basenzusammensetzung.

Durch eine intensive Untersuchung sollte nun versucht werden, diese Unterschiede durch genaue Basenanalysen zu bestätigen. Dazu wurden die DNAs beider Schwämme jeweils sieben Mal im HPLC-Trennsystem analysiert. Es wurden sieben verschiedene Hydrolysate der jeweils gleichen CsCl-gereinigten DNA-Charge verwendet. Es fand sich ein Basenquotient von 0,65 für *Geodia cydonium*, entsprechend einem AT-Gehalt von 39,3 Mol%, und ein Basenquotient von 0,67 für *Geodia limski*, entsprechend einem AT-Gehalt von 40,1 Mol%.

Die Fehlerbreite des Untersuchungssystems liegt für die Bestimmung des AT-Gehaltes bei ca. $\pm 1,7\%$. Dies führt zu einer möglichen Schwankungsbreite des AT-Gehaltes von *Geodia cydonium* nach oben bis zu 39,9 Mol% und zu einer möglichen unteren Grenze für *Geodia limski* von 39,4 Mol%. Dies bedeutet, daß die geringen feststellbaren Unterschiede in der Basenzusammensetzung beider Schwämme innerhalb der Fehlerbreite des Untersuchungssystems liegen und es nicht ermöglichen, eine statistisch signifikante Aussage zu treffen. Außerdem ist sicher von ausschlaggebender Bedeutung, daß jeweils nur eine DNA-Charge für die Bestimmungen verwendet werden konnte.

Es wäre die Aufgabe weiterer Untersuchungen, festzustellen, ob bei Verwendung von DNA-Chargen verschiedener Individuen statistisch-signifikant unterschiedliche Basengehalte ermittelt werden können.

Müller und Zahn (59) fanden 1968 eine neue Spezies der Familie Tethyidae und benannten sie nach ihrem Fundort, dem Limski-Kanal nahe Rovinj (Jugoslawien) an der nördlichen Adria.

Die Autoren führten diese neue Spezies in die Familie der Tethyidae zusätzlich zu der schon beschriebenen *Tethya lyncurium* (2.3.7) ein, da sie auf Grund der äußeren Unterschiede und des Fehlens von Bastard- und Übergangsformen zwischen beiden *Tethya*-Arten Standortmodifikationen ausschlossen.

Im Rahmen unserer Untersuchungen zeigte sich jetzt, daß die Basenquotienten beider Schwämme fast identisch sind. So weist *Tethya limski* (2.3.6) einen Ba-

senquotienten von 1,09 auf, entsprechend einem AT-Gehalt von 52,2 Mol%, während sich für *Tethya lyncurium* mit einem AT-Gehalt von 53,8 Mol% ein Basenquotient von 1,16 errechnet. Diese Unterschiede liegen, ähnlich der Situation bei *Geodia limski* und *Geodia cydonium*, innerhalb der Fehlerbreite des Untersuchungssystems, so daß in Bezug auf den Basenquotienten keine Aussage über die Identität der beiden Schwammarten getroffen werden kann.

Bei der Bestimmung des 5MC -Gehaltes konnte jedoch bei *Tethya limski* ein 5MC -Anteil von 1,2 Mol% sicher festgestellt werden, während in *Tethya lyncurium*-DNA kein 5MedCyd nachgewiesen wurde.

Dieser Befund scheint somit die Einführung von *Tethya limski* als neue Art und zweiten Vertreter der Familie Tethyidae zu rechtfertigen.

5 Zusammenfassung

Es wurde ein Verfahren zur Bestimmung des Basenquotienten von DNA-Chargen 19 verschiedener Schwämme der nördlichen Adria beschrieben. Zudem wurde eine Bestimmungsmethode für die Minoritätsbase 5MC dargestellt.

Die DNAs wurden mit der CtMe_3NBr -Methode präpariert. Dieses Verfahren gestattet relativ große Ausbeuten von 30% der Ausgangssubstanz. Die Verunreinigungen sind dabei sehr gering.

Die in den DNA-Präparationen verbliebenen RNA-Verunreinigungen wurden mit CsCl -Dichtegradientenzentrifugation abgetrennt. So wurde jeweils reine, native Doppelstrang-DNA erhalten.

Die CsCl -gereinigten DNA-Proben wurden durch die Einwirkung von Desoxyribonuklease, Phosphodiesterase und alkalischer Phosphatase zu den uniformen Desoxyribonukleosiden dAdo, dCyd, dGuo, dIno und dThd abgebaut.

Die Auftrennung der Desoxyribonukleoside wurde an einer 40 cm Säule an einem stark sauren Kationenaustauscher mit einer Partikelgröße von 10–12 μm innerhalb von 22 min erreicht. Als Elutionsmittel diente ein 0,4 M Ammoniumformiatpuffer, pH 4,6. Die Trenntemperatur betrug 55°C.

Bei vollständiger Auftrennung aller Fraktionen konnte die Quantisierung der Desoxyribonukleoside durch digitale Peakflächenintegration vorgenommen werden.

Die Fehlerbreite des Bestimmungssystems wurde durch einfache Varianzanalyse ermittelt. Es ergaben sich Variationskoeffizienten für die Desoxyribonukleoside dAdo, dCyd, dGuo und dThd von $\pm 1,47 - 1,89$.

Die Abtrennung des 5MedCyd von der dCyd-Fraktion wurde an einer 60 cm Trennsäule erreicht. Es gelang, 5MedCyd in der relativ kurzen Zeit von 35 min derart von der dCyd-Fraktion abzutrennen, daß eine semiquantitative Bestimmung durchgeführt werden konnte. Bei der Ermittlung der Basenzusammensetzung durch Peakhöhenmessung wurden sichere Ergebnisse bei 5MC -Gehalten bis hinab zu 1 Mol% erreicht, unterhalb dieser Grenze waren semiquantitative Bestimmungen und Ja-Nein Entscheidungen möglich.

Die Variationsbreite der Basenquotienten der untersuchten Schwamm-DNAs von 1,43 - 0,63 , entsprechend AT-Gehalten von 59,7 - 38,6 Mol%, läßt die Einordnung der Schwämme in den Bereich der Wirbellosen (1,7 - 0,6) zu.

Auch innerhalb der verschiedenen Ordnungen konnten bei den untersuchten DNAs relativ große Unterschiede der Basenquotienten festgestellt werden, so z.B. bei der Ordnung Hadromerina mit 1,16 - 0,83 und bei Keratosa mit 1,08 - 0,63.

Bei 8 der 19 Schwämme konnte 5MC nachgewiesen werden, und zwar in Anteilen von 2,2 - ca. 0,8 Mol%. Ein uniformes Auftreten von 5MC konnte bei den untersuchten Schwämmen der Ordnung Poecilosclerina mit relativ hohen Anteilen festgestellt werden. Die Werte schwankten dabei in einem Bereich von 2,2 - 1,4 Mol%.

Nicht nachgewiesen werden konnte 5MC bei den untersuchten Vertretern der Ordnungen Tetractinellida, Halichondrina und Haplosclerina, die alle zur Klasse Demospongiae gehören.

Nach dem 5MC -Gehalt ist eine Einordnung der Schwämme zwischen Pflanzen mit einem 5MC -Gehalt von 7-4 Mol% und Wirbeltieren mit einem Anteil von 1,5 Mol% (Mäuse-DNA) möglich.

Bei der vergleichenden Untersuchung der Schwämme *Geodia cydonium* und *Geodia limski* konnte ein statistisch signifikanter Unterschied in der Basenzusammensetzung nicht nachgewiesen werden.

Im Gegensatz hierzu unterscheiden sich die beiden Schwämme *Tethya lyncurium* und *Tethya limski*, bei sonst gleicher Basenzusammensetzung, durch einen auffälligen Unterschied im 5MC -Gehalt. *Tethya limski* enthält etwa 1,2 Mol% 5MC, während bei *Tethya lyncurium* diese Minoritätsbase nicht nachgewiesen werden konnte. Die Einführung von *Tethya limski* als zweiten Vertreter der Familie Tethyidae erscheint auf Grund dieses Befundes zusätzlich gerechtfertigt.

6 Literaturverzeichnis

- (1) Abderhalden, E. und A. Schittenhelm
Der Ab- und Aufbau der Nukleinsäuren im tierischen Organismus
Z. physiol. Chem. 47, 452-457 (1906)
- (2) Adams, R.L.P.
Newly synthesized DNA is not methylated
Biochim. Biophys. Acta 335, 365-373 (1974)
- (3) Anderson, N.G.
Analytical techniques for cell fractions
II. A spectrophotometric column monitoring system
Anal. Biochem. 4, 269-283 (1962)
- (4) Anderson, N.G., J.G. Green et al.
Analytical techniques for cell fractions.
III. Nucleotides and related compounds
Anal. Biochem. 6, 153-169 (1963)
- (5) Araki, T.
Über enzymatische Zersetzung der Nukleinsäure
Z. physiol. Chem. 38, 84-97 (1903)
- (6) Arber, W.
DNA modification and restriction
Progr. Nucleic Acid Research, 14, 1-37 (1974)
- (7) Bak, A.L.
DNA base composition in mycoplasma, bacteria and yeast
Current topics in microbiol. and immunol. 61, 89-150 (1973)
- (8) Bak, A.L., J.F. Atkins, and S.A. Meyer
Evolution of DNA base composition in microorganisms
Sci. 175, 1391-1393 (1972)
- (9) Bak, A.L., C. Christiansen and A. Stenderup
Unusual physical properties of mitochondrial DNA in yeast
Nature 224, 270-271 (1969)
- (10) Billen, D.
Methylation of bacterial chromosomes, an event at the "replication point"?
J. Mol. Biol. 31, 477-486 (1968)

- (11) Block, R.J., R. Le Strange and G. Zweig
Paper Chromatography, New York 1952
- (12) Breter, H.J.
persönliche Mitteilung (1975)
- (13) Breter, H.J., G. Seibert and R.K. Zahn
The use of high-pressure liquid cation-exchange chromatography for the
determination of 5-Methylcytosine content in DNA.
im Druck
- (14) Breter, H.J. and R.K. Zahn
A rapid separation of the four major deoxyribonucleosides and deoxyinosine
by high-pressure liquid cation-exchange chromatography
Anal. Biochem. 54, 346-352 (1973)
- (15) Brown, P.R.
The rapid separation of nucleotides in cell extracts using high-pressure
liquid chromatography
J. Chromatogr. 52, 257-272 (1970)
- (16) Brown, P.R.
High pressure liquid chromatography
New York London 1973
- (17) Chargaff, E.
Isolation and composition of deoxypentose nucleic acids and of the corres-
ponding nucleoproteins
in: Chargaff E. and J.N. Davidson (Hrsg.) The nucleic acids, Bd 1
New York 1955, S. 307-371
- (18) Cohn, W.E.
The separation of purine and pyrimidine bases and of nucleotides by ion
exchange
Sci. 109, 377-378 (1949)
- (19) Cohn, W.E.
The anion-exchange separation of ribonucleotides
J. Am. Chem. Soc. 72, 1471-1478 (1950)
- (20) Cohn, W.E.
Methods of isolation and characterization of mono- and polynucleotides
by ion exchange chromatography
Meth. Enzym. 3, 724-743 (1955)

- (21) Cohn, W.E.
The separation of nucleic acid derivatives by chromatography on ion-exchange columns
in: Chargaff, E. and J.N. Davidson (Hrsg.) The nucleic acids, Bd 1
New York 1955, S. 211-241
- (22) Cohn, W.E. and E. Volkin
On the structure of ribonucleic acids
I. Degradation with snake venom diesterase and the isolation of pyrimidine diphosphatases
J. Biol. Chem. 203, 319-332 (1953)
- (23) Cox, C.E. and C. Yanofsky
Altered base ratios in the DNA of an *Escherichia coli* mutator strain
Proc. Nat. Acad. Sci. 58, 1895-1902 (1967)
- (24) Cramer, F.
Papierchromatographie, 2. Auflage Weinheim (1953)
- (25) De Ley, J.
Reexamination of the association between melting point, buoyant density, and chemical base composition of deoxyribonucleic acid
J. Bact. 101, 738-754 (1970)
- (26) Feulgen, R.
Über a- und b-Thymonucleinsäure und das die a-Form in die b-Form überführende Ferment (Nucleogelase)
Z. physiol. Chem. 237, 261-267 (1935)
- (27) Fischer, F.G., J. Böttger und H. Lehmann-Echternacht
Über die Thymo-polynucleitidase aus Pankreas Nucleinsäuren V.
Z. physiol. Chem. 271, 246-264 (1941)
- (28) Freese, E.B. and E. Freese
On the specificity of DNA polymerase
Proc. nat. Acad. Sci. 57, 650-657 (1967)
- (29) Fredericq, E., A. Oth and F. Fontaine
The ultraviolet spectrum of deoxyribonucleic acids and their constituents
J. Mol. Biol. 3, 11-17 (1961)
- (30) Gibson, T., M.L. Scheppe and E. C. Cox
Fitness of an *Escherichia coli* mutator gene
Sci. 169, 686-688 (1970)

- (31) Gruenwedel, D.W. and C.-H. Hsu
Salt effects on the denaturation of DNA
Biopolymers 7, 557-570 (1969)
- (32) Hönig, W., R.K. Zahn and W. Heitz
A method for characterization and fractionation of deoxyribonucleic acid
by continuous turbidimetry of cetyltrimethylammonium-DNA precipitates
Anal. Biochem. 55, 34-50 (1973)
- (33) Horvath, C.G., B.A. Preiss and S.R. Lipsky
Fast liquid chromatography: An investigation of operating parameters and
the separation of nucleotides on pellicular ion exchange
Anal. Chem. 39, 1422-1428 (1967)
- (34) Hotchkiss, R.D.
The quantitative separation of purines, pyrimidines and nucleosides by
paper chromatography
J. Biol. Chem. 175, 315-332 (1948)
- (35) International Union of Biochemistry (IUB)
Enzyme Nomenclature 1972, Amsterdam 1973
- (36) Josgi, J.G., W.R. Guild and P. Handler
The presence of the two species of DNA in some halobacteria
J. Mol. Biol. 6, 34-38 (1963)
- (37) Karger, B.L.
The relationship of theory to practice in high-speed liquid chromatography
in: Kirkland, J.J. (Hrsg.) Modern practice of liquid chromatography
New York London 1971, S. 3 - 53
- (38) Kirkland, J.J.
A high performance ultraviolet photometric detector for use with efficient
liquid chromatographic columns
Anal. Chem. 40, 391-396 (1968)
- (39) Kirkland, J.J.
Controlled surface porosity supports for high speed gas and liquid chromatography
Anal. Chem. 41, 218-220 (1969)
- (40) Kirkland, J.J.
Modern practice of liquid chromatography
New York London 1971

- (41) Kirkland, J.J. and J.J. DeStefano
Controlled surface porosity with chemically-bonded organic stationary
phases for gas and liquid chromatography
J. Chromatogr. Sci. 8, 309-314 (1970)
- (42) Klein, W.
Experimentelle Studien über den Nukleinstoffwechsel.
III. Mitteilung. Über Adenin-desoxyribosid.
Z. physiol. Chem. 224, 244-251 (1934)
- (43) Lawley, P.D., A.R. Crathorn et al.
Biomethylation of deoxyribonucleic acid in cultured human tumor cells (HeLa)
Biochem. J. 128, 133-138 (1972)
- (44) Loring, H.S.
in: Chargaff, E. und J.N. (Hrsg.). The nucleic acids, Bd 1
New York 1955, S. 191-209
- (45) Mandel, M., L. Igambi et al.
Correlation of melting temperature and caesium chloride buoyant density
of bacterial deoxyribonucleic acid
J. Bact. 101, 333-338 (1970)
- (46) Mandel, M. and J. Marmur
Use of ultraviolet absorbance temperature profile for determining the
guanine plus cytosine content of DNA
Meth. Enzym. 12, Teil B 195-206 (1968)
- (47) Mandel, M., C.L. Schildkraut and J. Marmur
Use of CsCl density gradient analysis for determining the guanine plus
cytosine content of DNA
Meth. Enzym. 12, Teil B 184-195 (1968)
- (48) Marinus, M.G. and N.R. Morris
Biological function for 6-methyladenine residues in the DNA of Escherichia
coli K 12
J. Mol. Biol. 85, 309-322 (1974)
- (49) Marmur, J.
A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms
J. Mol. Biol. 3, 208-218 (1961)

- (50) Marmur, J. and P. Doty
Heterogeneity in deoxyribonucleic acids
I. Dependence on composition of the configurational stability of deoxyribonucleic acids
Nature 183, 1427-1428 (1959)
- (51) Marmur, J. and P. Doty
Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature
J. Mol. Biol. 5, 109-118 (1962)
- (52) Marmur, J., R. Rownd et al.
The nature of intergeneric episomal infection
Proc. nat. Acad. Sci. 47, 972-979 (1961)
- (53) Marmur, J., R. Rownd and C.L. Schildkraut
Denaturation of deoxyribonucleic acid
Progr. Nucleic Acid Res. 1, 231-300 (1963)
- (54) Marshak, A. and H.J. Vogel
Microdetermination of purines and pyrimidines in biological materials
J. Biol. Chem. 189, 597-605 (1951)
- (55) McDonald, M.
Deoxyribonucleases
Meth. Enzym. 2, 437-447 (1955)
- (56) Merrifield, R.B. and D.W. Wooley
The structure and microbiological activity of some dinucleotides isolated from yeast ribonucleic acid
J. Biol. Chem. 197, 521-537 (1952)
- (57) Meselson, M., F.W. Stahl and J. Vinograd
Equilibrium sedimentation of macromolecules in density gradients
Proc. nat. Acad. Sci. 43, 581-588 (1957)
- (58) Miller, O.J., W. Schnedl et al.
5-Methylcytosine localized in mammalian constitutive heterochromatin
Nature 251, 636-637 (1974)
- (59) Müller, W. und R.K. Zahn
Tethya limsli n. sp., eine Tethyide aus der Adria.
Senckenbergiana biol. 49, 469-478 (1968)

- (60) Pataki, G
Thin-layer chromatography of nucleic acid bases, nucleosides, nucleotides
and related compounds
Advan. Chromatogr. 7, 47-86 (1968)
- (61) Pataki, G. and A. Niederwieser
Thin-layer chromatography of nucleic acid bases, nucleosides, nucleotides
and related compounds
IV. Separation on PEI-Cellulose layers using gradient elution and direct
fluorometry spots
J. Chromatogr. 29, 133-141 (1967)
- (62) PL Biochemical Inc.
Biochemical reference guide and price list 103
Milwaukee (USA) 1973
- (63) Randerath, E. and K. Randerath
Ion-exchange thin layer chromatography
XII. Quantitative elution and microdetermination of nucleoside, mono-
phosphates, ATP, and other nucleotide coenzymes
Anal. Biochem. 12, 83-93 (1965)
- (64) Randerath, K.
Dünnschichtchromatographie von Nucleinsäure-Derivaten an Ionenaustauscher-
Schichten
Angew. Chem. 73, 436-436 (1961)
- (65) Randerath, K.
Dünnschichtchromatographie an Ionenaustauscher-Schichten. Trennung von
Nucleinsäure-Derivaten
Angew. Chem. 73, 674-676 (1961)
- (66) Randerath, K.
Polyäthylenimin-Cellulose - ein neuer Anionenaustauscher für die Chromato-
graphie von Nukleotiden
Biochim. Biophys. Acta 61, 852-854 (1962)
- (67) Randerath, K.
Thin-layer chromatography of nucleotides on layers of cellulose ion-exchangers
Nature 194, 768-769 (1962)

- (68) Randerath, K. and E. Randerath
Thin-layer separation methods for nucleic acids derivatives
Meth. Enzym. 12, 323-347 (1967)
- (69) Riedel, R.
Flora und Fauna der Adria
Hamburg und Berlin 1963
- (70) Riggs, A.D.
X inactivation, differentiation, and DNA methylation
Cytogenet. Cell Genet. 14, 9 - 25 (1975)
- (71) Salomon, R. and A.M. Kaye
Methylation of mouse DNA in vivo :
Di- and tripyrimidine sequences containing 5-Methylcytosine
Biochim. Biophys. Acta 204, 340-351 (1970)
- (72) Salomon, R., A.M. Kaye, and M. Herzberg
Mouse nuclear satellite DNA :
5-Methylcytosine content, pyrimidine isoplith
Distribution and electron microscopic appearance
J. Mol. Biol. 43, 581-592 (1969)
- (73) Schildkraut, C.L., J. Marmur and P. Doty
Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its
buoyant density in CsCl.
J. Mol. Biol. 4, 430-443 (1962)
- (74) Schmidt, G.
Nucleases and enzymes attacking nucleic acid components
in : Chargaff, E. und J.N. Davidson (Hrsg.) The nucleic acids
Bd 1 New York 1955, S. 555-626
- (75) Schmidt, G., E.G. Pickels and P.A. Levene
Enzymatic dephosphorylation of deoxyribonucleic acids of various degrees
of polymerization
J. Biol. Chem. 127, 251-259 (1939)
- (76) Schwarz Bioresearch Inc.
Catalog 1967 Orangeburg New York 1967

- (77) Scott, Ch.D. and N.E. Lee
Dynamic packing of ion-exchange chromatographic columns
J. Chromatogr. 42, 263-265 (1969)
- (78) Shapiro, H.S. and E. Chargaff
Studies of the nucleotide arrangement in deoxyribonucleic acids
IV. Patterns of nucleotide sequence in the deoxyribonucleic acid of rye
germ and its fractions
Biochim. Biophys. Acta 39, 68-82 (1960)
- (79) Singer, C.E. and B.N. Ames
Sunlight ultraviolet and bacterial DNA base ratios
Sci. 170, 822-826 (1970)
- (80) Sinsheimer, R.L.
The action of pancreatic deoxyribonuclease
I. Isolation of mono- and dinucleotides
J. Biol. Chem. 208, 445-459 (1954)
- (81) Sinsheimer, R.L.
The action of pancreatic deoxyribonuclease
II. Isomeric dinucleotides
J. Mol. Biol. 215, 579-583 (1955)
- (82) Snyder, L.R. and J.J. Kirkland
Introduction to modern liquid chromatography
New York London 1974
- (83) Stahl, E.
Dünnschicht-Chromatographie
2. Auflage Berlin 1967
- (84) Sueoka, N., J. Marmur, and P. Doty
Heterogeneity in deoxyribonucleic acids
II. Dependence of the density of deoxyribonucleic acids on guanine-
cytosine content
Nature, 183, 1429-1431 (1959)
- (85) Takahashi, I. and J. Marmur
Replacement of thymidylic acid by deoxyuridylic acid in the deoxyribonucleic
acid of a transducing phage for *Bacillus subtilis*
Nature 197, 794-795 (1963)

- (86) Träger, L.
Einführung in die Molekularbiologie
Stuttgart 1975
- (87) Uziel, M., C.K. Koh and W.E. Cohn
Rapid ion-exchange chromatographic microanalysis of ultraviolet-absorbing materials and its application to nucleosides
Anal.Biochem. 25, 77-98 (1968)
- (88) Vanyushin, B.F., L.E. Nemirovsky et al.
The 5-Methylcytosine in DNA of rats
Gerontologia 19, 138-152 (1973)
- (89) Vasilenko, S.K., S.G. Kamzolova and D.G. Knorre
Direct spectrophotometric method for quantitative determination of nucleotide composition of ribonucleic acids
Biokhimiya (engl. Übersetzung) 27, 116-121 (1962)
- (90) Venner, H. and H. Reinert
Possible role of methylated DNA bases for the transcription of the genetic information
Z. Allg. Mikrobiol. 13, 613-624 (1973)
- (91) Vinograd, J., J. Morris et al.
The buoyant behaviour of viral and bacterial DNA in alkaline CsCl
Proc.nat. Acad. Sci. 49, 12-17 (1963)
- (92) Vischer, E. and E. Chargaff
The separation and characterization of purines in minute amounts of nucleic acid hydrolysates
J. Biol. Chem. 168, 781-782 (1947)
- (93) Vischer, E. and E. Chargaff
The composition of the pentose nucleic acids of yeast and pancreas
J. Biol. Chem. 176, 715-734 (1948)
- (94) Volkin, E. and W.E. Cohn
On the structure of ribonucleic acids
II. The products of ribonuclease action
J. Biol. Chem. 205, 767-782 (1953)

- (95) Wang, S.Y.
The determination of nucleic acid base composition by chemical reactivity
Meth. Enzym. 12, Teil B 178-184 (1968)
- (96) Wyatt, G.R.
Separation of nucleic acid components by chromatography on filter paper
in: Chargaff, E. und J.N. Davidson (Hrsg.) The nucleic acids, Bd I
New York 1955 , S. 243-265
- (97) Ycas, M.
The biological code
Amsterdam London 1969
- (98) Zahn, R.K.
persönliche Mitteilung (1975)
- (99) Zahn-Daimler, G., W.E.G. Müller et al.
Regenerating sponge cubes as a model in the impact evaluation of inter-
mittant city and factory waste pollution
Sci. tot. Environment 4, 299-309 (1975)

Lebenslauf

Am 23.4.1949 wurde ich in Sobernheim/Nahe als Sohn des Facharztes für Chirurgie, Dr. med. Otto Hundt und seiner Ehefrau Hedwig, geb. Thress, geboren.

Von 1955 bis 1959 besuchte ich die katholische Volksschule in Sobernheim/Nahe, anschließend von Frühjahr 1959 bis zur Reifeprüfung am 19.6.1967 das Staatliche Neusprachliche Gymnasium in Sobernheim/Nahe.

Ab WS 1967/68 studierte ich Naturwissenschaften in Mainz, zum SS 1968 Übernahme in die Medizinische Fakultät der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz. Dort bestand ich am 12.12.1973 das medizinische Staatsexamen.

Von Juni 1974 arbeitete ich als Doktorand am Physiologisch-chemischen Institut der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz bis Juli 1975.

